

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



**POTENCIAL NEURORREPARADOR DEL
FACTOR DE CRECIMIENTO DE HÍGADO
EN UN MODELO DE PARKINSON
EXPERIMENTAL**

TESIS DOCTORAL

Rafael Daniel Gonzalo Gobernado

Madrid, 2013

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



POTENCIAL NEURORREPARADOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HÍGADO EN UN MODELO DE PARKINSON EXPERIMENTAL

Memoria de la Tesis para optar al grado de Doctor presentada por el
Licenciado en Biología:

Rafael Daniel Gonzalo Gobernado

Directores de la Tesis:

Dra. Eulalia Bazán Izquierdo

Dr. Antonio Sánchez Herranz

Dra. Diana Reimers Cerdá

Servicio de Neurobiología-Investigación
Hospital Universitario Ramón y Cajal
Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)

HOSPITAL RAMON Y CAJAL
Laboratorio de Neurobiología de las Células Madre
Servicio de Neurobiología
Departamento de Investigación

Carretera de Colmenar, Km 9.1
28034 Madrid, España
Tfno: +34-91-336-8168
Fax: +34-91-336-9016

Los Drs. Eulalia Bazán Izquierdo, Antonio Sánchez Herranz y Diana Reimers Cerdá, facultativos del Servicio de Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal, como directores del trabajo de investigación de la Tesis Doctoral: “Potencial Neurorregenerador del Factor de Crecimiento de Hígado en un modelo de Parkinson Experimental” realizada en la Laboratorio de Neurobiología de las Células Madre del Servicio de Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

CERTIFICAN:

Que este estudio experimental llevado a cabo por Don Rafael Daniel Gonzalo Gobernado es satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Dra. Eulalia Bazán Izquierdo
e-mail: eulalia.bazan@hrc.es

Dr. Antonio Sánchez Herranz
e-mail: antonio.sanchez@hrc.es

Dra. Diana Reimers Cerdá
e-mail: diana.reimers@hrc.es

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Neurobiología de las Células Madre del Servicio de Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal gracias a una beca predoctoral Pfizer-Fibio y a un contrato de Técnico Titulado Superior de apoyo a la investigación del ISCIII, y al apoyo económico de los proyectos: FIS PI060315 y Agencia Pedro Laín Entralgo NDG 09/7.

ÍNDICE

ÍNDICE

I. RESUMEN	Pág. 9
II. ABREVIATURAS	Pág. 13
III. INTRODUCCIÓN	Pág. 19
1. Enfermedad de Parkinson	Pág. 21
1.1 Definición y aspectos generales	Pág. 21
1.2 Tratamiento	Pág. 24
1.3 Modelos experimentales de EP inducidos por neurotoxinas	Pág. 25
1.3.1 Modelo de 6-OHDA	Pág. 25
1.3.2 Modelo de MPTP	Pág. 29
1.3.3 Modelo de Rotenona	Pág. 30
2. Factores neurotróficos en la Enfermedad de Parkinson	Pág. 32
2.1 BDNF	Pág. 33
2.2 GDNF	Pág. 35
2.3 Neurturina	Pág. 38
2.4 MANF y CDFN	Pág. 39
3. Liver Growth Factor (Factor de Crecimiento de Hígado)	Pág. 40
3.1 Antecedentes	Pág. 40
3.2 Naturaleza química del LGF	Pág. 41
3.3 Efectos biológicos del LGF	Pág. 42
3.4 Mecanismos y células implicadas en la acción del LGF	Pág. 44
4. Terapia con células madre en la Enfermedad de Parkinson	Pág. 45
4.1. Neurogénesis en el Sistema Nervioso Central adulto	Pág. 45
4.2. Estimulación de la neurogénesis adulta en la EP	Pág. 47
4.3. Terapias basadas en el trasplante de células madre en la EP	Pág. 50
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	Pág. 55

V. MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 59
1. Reactivos	Pág. 61
1.1 Reactivos de uso general	Pág. 61
1.2 Reactivos para histología	Pág. 61
1.3 Reactivos para bioquímica	Pág. 62
1.4 Reactivos para cultivos celulares	Pág. 63
2. Purificación del Factor de Crecimiento de Hígado (LGF)	Pág. 63
3. Animales y modelo experimental de Enfermedad de Parkinson	Pág. 64
4. Cultivos celulares	Pág. 66
4.1 Obtención de células madre neurales a partir del estriado embrionario de rata	Pág. 66
5. Estudios de comportamiento	Pág. 66
5.1 Test de Conducta Rotacional	Pág. 66
5.2 Evaluación de la coordinación motora (test Rota Rod)	Pág. 67
6. Administración de LGF e implantes celulares	Pág. 67
6.1 Preparación de minibombas osmóticas para infusión intracerebral	Pág. 67
6.2 Infusión intraestriatal de LGF	Pág. 68
6.3 Infusión intraventricular de LGF	Pág. 69
6.4 Implantes de células madre neurales e infusión de LGF en el estriado de ratas sanas y lesionadas con 6-OHDA	Pág. 70
6.5 Administración intraperitoneal de LGF	Pág. 71
7. Estudio de la proliferación celular	Pág. 72
8. Histología	Pág. 73
8.1 Procesado del tejido	Pág. 73
8.2 Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica	Pág. 73
8.3 Análisis morfométrico	Pág. 75
8.3.1 Análisis morfométrico en la infusión IS	Pág. 75

8.3.2 Análisis morfométrico en la infusión ICV	Pág. 76
8.3.4 Análisis morfométrico en la administración IP	Pág. 76
8.3.5 Análisis morfométrico de los implantes de células madre neurales	Pág. 77
9. Determinaciones bioquímicas	Pág. 78
9.1 Preparación de extractos tisulares para Western Blot	Pág. 78
9.1.1 Disección del tejido	Pág. 78
9.1.2 Procesado del tejido	Pág. 78
9.2 Determinación de la concentración de proteínas	Pág. 79
9.3 Técnicas de separación y análisis de proteínas (<i>Western blot</i>)	Pág. 79
9.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	Pág. 79
9.3.2 Transferencia a membrana	Pág. 79
9.3.3 Inmunodetección	Pág. 80
9.3.4 Revelado por quimioluminiscencia	Pág. 81
9.3.5 Revelado del control de carga con fosfatasa alcalina	Pág. 81
9.3.6 Re-inmunodetección	Pág. 82
9.3.7 Análisis densitométrico	Pág. 82
9.4 Determinación de la concentración de dopamina por HPLC	Pág. 82
10. Análisis estadístico de los datos	Pág. 83
VI. RESULTADOS	Pág. 85
1. Infusión intracerebroventricular de LGF	Pág. 87
1.1 La infusión ICV de LGF estimula la proliferación celular y la expresión de Nestina en la ZSV de ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 87
1.2 El LGF promueve la proliferación de los neuroblastos y su migración en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 89
1.3 El LGF estimula la proliferación de la microglía en los ventrículos laterales y en el tercer ventrículo de ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 94
1.4 Efectos de la infusión ICV de LGF sobre la innervación positiva para tirosina hidroxilasa	Pág. 96
1.5 La infusión ICV de LGF no mejora la función motora	Pág. 96
2. Infusión intraestriatal de LGF	Pág. 97
2.1 Efectos de la infusión IS de LGF sobre la innervación dopaminérgica	Pág. 97
2.2 La infusión IS de LGF restaura parcialmente la función motora	Pág. 99

2.3 La infusión IS de LGF estimula la proliferación y la activación de la microglía en el estriado	Pág. 100
2.4 Efectos de la administración IS de LGF sobre la supervivencia celular	Pág. 103
3. Administración intraperitoneal de LGF	Pág. 104
3.1 Efectos de la administración intraperitoneal de LGF sobre la expresión de tirosina hidroxilasa	Pág. 104
3.2 El tratamiento con LGF IP estimula la expresión de DAT en el estriado lesionado de ratas hemiparkinsonianas	Pág. 107
3.3 La administración IP de LGF mejora la conducta rotacional y la coordinación motora de los animales hemiparkinsonianos	Pág. 109
3.4 El factor de crecimiento de hígado activa a las células gliales y estimula la expresión de TNF- α en las ratas hemiparkinsonianas	Pág. 111
3.4.1 Efectos del LGF sobre la activación de la glía en el estriado y en el mesencéfalo lesionados	Pág. 111
3.4.2 El LGF estimula la expresión de TNF- α en el estriado lesionado con 6-OHDA	Pág. 115
3.4.3 Efectos del LGF sobre la activación de la glía y la expresión de TNF- α en el estriado y el mesencéfalo sanos	Pág. 117
3.5 Activación de las vía de señalización de MAPK/ERK1/2 y efectos sobre la fosforilación de CREB mediante el tratamiento con LGF.	Pág. 119
3.6 Efectos del LGF sobre la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2	Pág. 124
4. Implantes de células madre neurales e infusión de LGF	Pág. 127
4.1 Efectos de la infusión IS de LGF sobre la distribución de las células madre neurales implantadas	Pág. 127
4.2 Estudio de los fenotipos celulares derivados de las CMN implantadas	Pág. 130
4.3 Efectos de las CMN implantadas sobre la conducta rotacional y la innervación positiva para tirosina hidroxilasa	Pág. 132
VII. DISCUSIÓN	Pág. 135
1. Efectos del LGF sobre los marcadores dopaminérgicos y la función motora	Pág. 137
2. El LGF como inductor de la proliferación celular y la neurogénesis. Efectos de la coadministración de CMN y LGF	Pág. 142
2.1 Papel del LGF en la proliferación celular y la neurogénesis	Pág. 142
2.2 Efectos de la administración conjunta de LGF y CMN	Pág. 144
3. Posibles células diana del LGF. Papel del TNF-α	Pág. 146
3.1 LGF y activación de la microglía	Pág. 146

3.2 Efectos del LGF sobre los astrocitos y las células endoteliales	Pág. 148
3.3 Papel del TNF- α en la acción del LGF	Pág. 150
4. Efectos sobre la supervivencia celular y posibles vías de señalización implicadas en la acción del LGF	Pág. 152
4.1 LGF y supervivencia celular	Pág. 152
4.2 Vías de señalización implicadas en la acción del LGF	Pág. 153
4.3 Posibles mecanismos de acceso del LGF al SNC	Pág. 155
VIII. CONCLUSIONES	Pág. 157
IX. BIBLIOGRAFÍA	Pág. 161
ANEXO	Pág. 189

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Secciones del mesencéfalo de un individuo normal y de un paciente con EP. Cuerpos de Lewy	Pág. 23
Figura 2. Mecanismo de neurotoxicidad de la 6-OHDA	Pág. 26
Figura 3. Respuestas rotacionales inducidas por apomorfina y por anfetamina	Pág. 28
Figura 4. Esquema de la metabolización y la oxidación del MPTP	Pág. 30
Figura 5. Neurogénesis en la Zona Subventricular de la rata adulta	Pág. 46
Figura 6. Estimulación de la Neurogénesis en la Zona Subventricular del cerebro adulto en la EP.	Pág. 49
Figura 7. Esquema representativo del cultivo de células madre neurales (CMN) mediante la técnica de formación de neuroesferas	Pág. 50
Figura 8. Esquema representativo de varias estrategias utilizadas en las terapias experimentales con células madre en la EP	Pág. 53
Figura 9. Esquema representativo de la infusión intraestriatal de LGF	Pág. 69
Figura 10. Esquema representativo de la infusión intraventricular de LGF	Pág. 70
Figura 11. Esquema representativo del proceso de implante de células madre neurales y de la aplicación de bombas de infusión intraestriatal	Pág. 71
Figura 12. Esquema representativo de la administración intraperitoneal de LGF	Pág. 72
Figura 13. El factor de crecimiento de hígado estimula la proliferación celular y la expresión de Nestina en ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 88

Figura 14. Actividad Neurogénica del LGF en ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 90
Figura 15. El LGF promueve la proliferación de Neuroblastos y la reactividad glial en ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 92
Figura 16. El LGF incrementa la incorporación de BrdU en ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 93
Figura 17. El LGF estimula la proliferación de la microglía dentro del lumen de los ventrículos laterales y del tercer ventrículo de ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 95
Figura 18. La infusión IS de LGF induce la expresión de TH en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 98
Figura 19. Efectos de la infusión IS de LGF en la expresión de TH	Pág. 99
Figura 20. Efecto de la infusión IS de LGF sobre la conducta rotacional inducida por apomorfina	Pág. 100
Figura 21. La infusión IS de LGF promueve la proliferación y la activación de la microglía en el estriado de las ratas lesionadas 6-OHDA	Pág. 101
Figura 22. Estudio de los efectos de la administración IS de LGF sobre la proliferación celular y la activación de la microglía en el estriado lesionado con 6-OHDA	Pág. 102
Figura 23. Efectos de la administración IS de LGF sobre la supervivencia celular en el estriado lesionado de ratas hemiparkinsonianas	Pág. 103
Figura 24. Efecto de la administración de LGF sobre la expresión de TH	Pág. 105
Figura 25. Expresión de TH y DAT en el estriado de animales hemiparkinsonianos tratados con LGF	Pág. 106
Figura 26. Estudio de la expresión y de la distribución de TH y DAT en el estriado y la SNpc de animales hemiparkinsonianos tratados con LGF	Pág. 108
Figura 27. Efectos de la administración de LGF sobre la conducta rotacional y la coordinación motora	Pág. 110
Figura 28. Expresión de PCNA, Glut-5 y OX6 en el estriado de animales hemiparkinsonianos tratados con LGF	Pág. 112
Figura 29. Efectos de la administración de LGF sobre la activación y la proliferación de la microglía	Pág. 113
Figura 30. Expresión de GFAP en el estriado de animales hemiparkinsonianos tratados con LGF	Pág. 114
Figura 31. Efectos de la administración de LGF sobre la astrogliá	Pág. 114
Figura 32. Efectos de la administración de LGF sobre la expresión de TNF- α	Pág. 116
Figura 33. Efectos de la administración de LGF sobre la activación de la microglía y la expresión de TNF- α en el estriado sano de animales lesionados con 6-OHDA	Pág. 117
Figura 34. Expresión de PCNA, GFAP y Glut-5 en el estriado sano de animales hemiparkinsonianos tratados con LGF	Pág. 118
Figura 35. Efectos de la administración de LGF sobre la activación microglial en el mesencéfalo sano	Pág. 119
Figura 36. Efectos de la administración de LGF sobre la fosforilación de ERK1/2 en el estriado	Pág. 120
Figura 37. Efectos de la administración de LGF sobre la expresión de fosfo-CREB	Pág. 122

Figura 38. Efectos de la administración de LGF sobre la fosforilación de ERK1/2 y la expresión de fosfo-CREB en el estriado sano	Pág. 123
Figura 39. Efectos de la administración de LGF sobre la supervivencia celular en el estriado y en el mesencéfalo	Pág. 125
Figura 40. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de Bcl-2 en la SNpc de los animales tratados con LGF	Pág. 126
Figura 41. Distribución de las CMN implantadas en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 128
Figura 42. Efectos de la infusión intraestriatal de LGF sobre la supervivencia y la diferenciación de las CMN implantadas	Pág. 129
Figura 43. Fenotipos celulares neurales y no neurales derivados de las CMN implantadas en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 131
Figura 44. Efectos de la coadministración de LGF y CMN sobre la conducta rotacional de las ratas hemiparkinsonianas	Pág. 132
Figura 45. Estudio de la expresión de TH en el estriado de animales con implantes de CMN	Pág. 133
Figura 46. Efectos de las CMN implantadas y de la infusión de LGF sobre la expresión de TH en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA	Pág. 134
Figura 47. Activación de la microglía	Pág. 148
Tabla 1. Principales genes relacionados con la EP	Pág. 23
Tabla 2. Efecto de los Factores Neurotróficos sobre las neuronas dopaminérgicas	Pág. 33
Tabla 3. Anticuerpos primarios empleados en Histología	Pág. 74
Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados en Western blot	Pág. 80
Tabla 5. Efecto de la administración de LGF sobre los niveles de dopamina estriatales de los animales hemiparkinsonianos	Pág. 106

I.- RESUMEN

RESUMEN

El factor de crecimiento de hígado (LGF) es un mitógeno hepático que tiene la capacidad de estimular la regeneración tisular y la proliferación celular tanto en el hígado como en tejidos extrahepáticos. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar los posibles efectos regenerativos y/o neuroprotectores, así como la estimulación de las células madre neurales (CMN) adultas y de origen fetal, ejercidos por el tratamiento con LGF en un modelo experimental de Enfermedad de Parkinson (EP) por lesión con 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

El estudio de los efectos de la administración de LGF reveló que este factor fomenta la neurogénesis y la supervivencia celular, promueve la migración de las nuevas neuronas generadas y estimula el crecimiento de los terminales positivos para tirosina hidroxilasa en el estriado lesionado. Además, el tratamiento con LGF incrementa los niveles de dopamina estriatales y protege parcialmente de la neurotoxicidad inducida por la 6-OHDA a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra de los animales hemiparkinsonianos. El LGF también provoca la supervivencia de las CMN de origen fetal implantadas en el estriado carente de dopamina, reduce la conducta rotacional inducida por apomorfina y mejora la coordinación motora en este modelo experimental de EP. Los resultados indican que la microglía podría ser la diana celular del LGF en el sistema nervioso central. Por último, la actividad del LGF podría estar mediada por la estimulación de las vía de señalización MAPK/ERK1/2 y por la regulación de proteínas críticas para la supervivencia celular como son Bcl-2 y fosfo-CREB.

Debido a los efectos neuroprotectores, neuroregenerativos y neurogénicos ejercidos por el LGF en ratas hemiparkinsonianas, podemos sugerir la posible utilidad de este factor novel en el tratamiento de la EP.

ABSTRACT

Liver growth factor (LGF) is a hepatic mitogen which has the ability to stimulate tissue regeneration and cell proliferation in both liver and extrahepatic tissues. The aim of this work was to evaluate the regenerative and / or neuroprotective effects, and the stimulation of foetal and adult neural stem cells (NSC), exerted by LGF treatment in a rat model of Parkinson's disease (PD) induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA).

The study of the effects carried out by LGF administration showed that this factor stimulates neurogenesis and cell survival, promotes migration of newly generated neurons, and induces the outgrowth of tyrosine hydroxylase-positive terminals in the lesioned striatum. Furthermore, LGF treatment raises striatal dopamine levels and partially protects dopaminergic neurons of the *substantia nigra* of hemiparkinsonian animals from 6-OHDA neurotoxicity. LGF also stimulates survival of grafted foetal NSC's in the dopamine-depleted striatum, reduces apomorphine-induced rotational behaviour and improves motor coordination in this experimental model of PD. The results indicate that microglia could be the cellular target of LGF in the central nervous system. Finally, the activity of LGF could be mediated by the stimulation of MAPK/ERK1/2 signalling pathway and by regulating critical proteins for cell survival, such as Bcl-2 and phospho-CREB.

Since LGF showed neuroprotective, neuroregenerative and neurogenic effects in 6-OHDA-lesioned rats, we propose LGF as a novel factor that may be useful in the treatment of Parkinson's disease.

II.- ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BrdU	Bromodeoxiuridina
CME	Células madre embrionarias
CMN	Células madre neurales
CREB	Proteína de unión a elementos que responden a AMPc
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DCX	Doblecortina
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EP	Enfermedad de Parkinson
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FN	Factor neurotrófico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP	Proteína ácida fibrilar de la glía
GLUT-5	Transportador de glucosa 5
IB4	Isolectina B4
ICV	Intracerebroventricular
ICV-LGF 15d	Infusión ICV de LGF durante 15 días y sacrificio
ICV-LGF 30d	Infusión ICV de LGF durante 15 días y sacrificio a los 30 días del inicio de la infusión
ICV-LGF 7d	Infusión ICV de LGF durante 7 días y sacrificio
ICV-Vehículo 15d	Infusión ICV de vehículo durante 15 días y sacrificio
ICV-Vehículo 30d	Infusión ICV de vehículo durante 15 días y sacrificio a los 30 días del inicio de la infusión
ICV-Vehículo 7d	Infusión ICV de vehículo durante 7 días y sacrificio
IP	Intraperitoneal

IP-LGF	Administración IP de LGF durante 3 semanas y sacrificio 4 semanas después del fin del tratamiento
IP-LGF 24-48-72H	Administración de una dosis IP de LGF y sacrificio a las 24, 48 ó 72 horas
IP-Vehículo	Administración IP de vehículo durante 3 semanas y sacrificio 4 semanas después del fin del tratamiento
IP-Vehículo 24-48-72H	Administración de una dosis IP de Vehículo y sacrificio a las 24, 48 ó 72 horas
IS	Intraestriatal
IS-LGF 15d	Infusión IS de LGF durante 15 días y sacrificio 2 semanas después del fin del tratamiento
IS-LGF 24H	Inyección IS de LGF y sacrificio a las 24 horas
IS-LGF 48H	Inyección IS de LGF y sacrificio a las 48 horas
IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS	Implante + Infusión IS de LGF 15d y sacrificio a las 6 semanas en animales hemiparkinsonianos
IS-LGF-SANAS-CÉLULAS	Implante + Infusión IS de LGF 15d y sacrificio a las 6 semanas en animales sanos
IS-Vehículo 15d	Infusión IS de vehículo durante 15 días y sacrificio 2 semanas después del fin del tratamiento
IS-Vehículo 24H	Inyección IS de vehículo y sacrificio a las 24 horas
IS-Vehículo 48H	Inyección IS de vehículo y sacrificio a las 48 horas
IS-Vehículo-6-OHDA-CÉLULAS	Implante + Infusión IS de vehículo 15d y sacrificio a las 6 semanas en animales hemiparkinsonianos
IS-Vehículo-SANAS-CÉLULAS	Implante + Infusión IS de vehículo 15d y sacrificio a las 6 semanas en animales sanos
L-DOPA	3,4,dihidroxifenilalanina
LGF	<i>Liver Growth Factor</i> , Factor de Crecimiento de Hígado
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NeuN	Proteína del núcleo neuronal
NGF	Factor de crecimiento nervioso
OX6	Clon que genera anticuerpos frente al complejo mayor de histocompatibilidad clase II

PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
RIP	Anticuerpo frente a oligodendrocitos (antígeno desconocido)
S-100B	Proteína S100 de unión a calcio B
Sanas-ICV-LGF 7d	Infusión ICV de LGF en ratas sanas durante 7 días y sacrificio
Sanas-ICV-Vehículo 7d	Infusión ICV de vehículo en ratas sanas durante 7 días y sacrificio
SN	Sustancia Negra
SNC	Sistema Nervioso Central
SNpc	Sustancia Negra <i>pars compacta</i>
STR	Estriado
TGF- α	Factor de crecimiento transformante alfa
TH	Tirosina hidroxilasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VMAT-2	Transportador vesicular de monoaminas 2
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

III.- INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON.

1.1 Definición y aspectos generales.

La enfermedad de Parkinson (EP) fue inicialmente descrita por James Parkinson en 1817 en su ensayo sobre la parálisis agitante en el cual describió las características clínicas principales de este desorden neurodegenerativo (Parkinson. 1817). La EP es el trastorno neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer. Alrededor de 5 millones de personas padecen esta enfermedad en el mundo, existiendo un millón de casos tanto en Europa como en los Estado Unidos de Norteamérica. Entre el 1% y el 2% de las personas mayores de 60 años padecen esta enfermedad (de Lau y Breteler. 2006).

Las manifestaciones clínicas más destacadas de los pacientes con EP son el temblor en reposo, la lentitud en los movimientos (bradicinesia), la rigidez muscular, la alteración de lo reflejos posturales y la dificultad de la marcha (Obeso y cols. 1998; Olanow y cols. 2009). Además, existen otros síntomas y signos no motores asociados a esta enfermedad tales como la disautonomía, alteraciones sensoriales, trastornos del sueño, cognitivos y demencia (Jankovic. 2008).

La EP se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas que proyectan desde la Sustancia Negra pars compacta (SNpc) al estriado (Figura 1A), lo que se asocia a una disminución de los niveles del neurotransmisor dopamina (DA) debido a la pérdida de enzimas de síntesis de DA como la tirosina hidroxilasa [TH, (enzima limitante de la síntesis de catecolaminas)] y a una fuerte reducción de los marcadores presinápticos dopaminérgicos. La degeneración neuronal en la SNpc se localiza especialmente en la región ventrolateral seguida de las regiones medioventrales, dorsales y la laterales, aunque este proceso degenerativo también afecta a otros núcleos del tronco del encéfalo y del diencefalo. La pérdida de las aferencias dopaminérgicas que parten de la SNpc hacia el estriado da lugar a un incremento de la actividad de la vía indirecta (estriado-globo pálido externo-núcleo subtalámico-globo pálido interno / SN pars reticulata) del circuito motor y a una reducción de la actividad de la vía directa (estriado-globo pálido interno / SN pars reticulata) del mismo circuito (Albin y cols. 1989). Estas alteraciones generan hiperactividad neuronal en el globo pálido interno y en la SN pars reticulata lo que a su vez da lugar a un exceso de inhibición sobre sus dianas talámicas y troncoencefálicas,

diminuyendo así la excitación talamocortical y generando una desaferentación funcional de la corteza motora suplementaria y de la propia corteza motora. Ambas disfunciones están relacionadas respectivamente con la bradicinesia y la rigidez características de la enfermedad (Mattay y cols. 2002). Sin embargo, el temblor podría estar relacionado con un conjunto de subcircuitos entre el tálamo y los ganglios basales diferentes a los que están implicados en la hipocinesia y la rigidez. La EP también está asociada con la amplia patología no dopaminérgica lo que implica que también estén afectadas las neuronas colinérgicas de los núcleos basales de Meynert, las neuronas adrenérgicas del *locus coeruleus*, las neuronas serotoninérgicas del rafe, además de neuronas pertenecientes a la corteza cerebral, tronco del encéfalo, médula espinal y del sistema nervioso periférico (Forno. 1996). Por estas razones, hay que considerar a esta enfermedad como una patología multisistémica ya que afecta a varios sistemas cerebrales. Estudios recientes sugieren que la patología no dopaminérgica, en particular la asociada al núcleo motor dorsal y a las regiones olfatorias, preceden al inicio de la manifestación de la patología dopaminérgica de la SNpc (Braak y cols. 2003).

La degeneración neuronal va emparejada con la aparición de inclusiones esféricas intracitoplasmáticas de naturaleza proteica con un cuerpo central eosinófilo y un halo único o multilaminado y que contienen α -sinucleína, denominadas cuerpos de Lewy (Spillantini y cols. 1997) (Figura 1B y 1C). Los cuerpos de Lewy también contienen neurofilamentos que han sufrido transformaciones por fosforilación, ubiquitinación, proteólisis y entrecruzamiento, otras proteínas estructurales (tubulinas, tau, proteínas asociadas a microtúbulos, proteína precursora de β -amiloide, calbindina), enzimas relacionados con la fosforilación, enzimas asociadas a la vía de degradación mediada por ubiquitina, proteínas asociadas a la sinapsis y a chaperonas (Lucking y Brice. 2000; Goedert. 2001; Dev y cols. 2003).

La muerte neuronal, progresiva y de etiopatogenia desconocida, provoca una disminución paulatina de los niveles de DA en estriado, lo que produce un desequilibrio funcional en los circuitos neuroquímicos cerebrales con el consiguiente desarrollo de los signos y síntomas típicos de esta enfermedad que previamente se han comentado. La existencia de mecanismos compensadores hace que se retrasen los eventos funcionales de la degeneración dopaminérgica hasta que ésta afecta al menos al 70% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

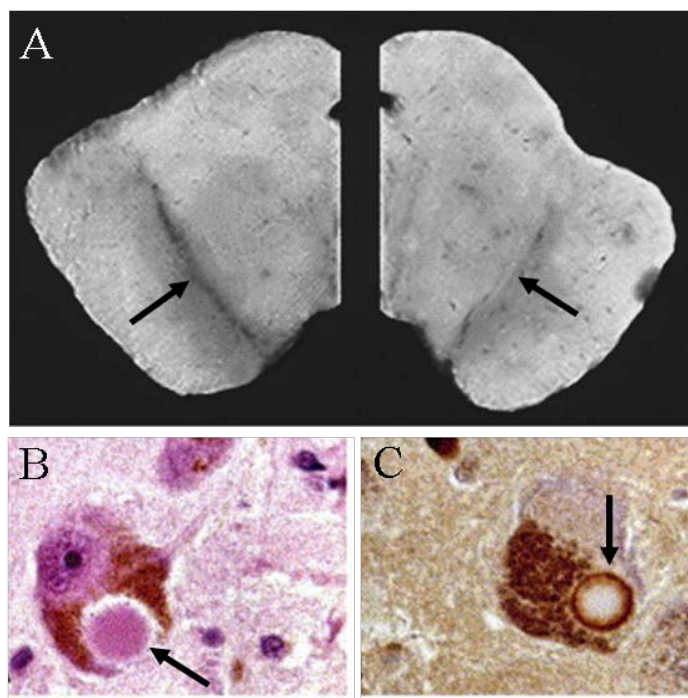


Figura 1. Secciones cerebrales correspondientes al mesencéfalo (A) de un individuo normal (izquierda) y al mesencéfalo de un paciente con EP (derecha). Nótese la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc en el mesencéfalo ventral del individuo con EP (derecha). En B se muestra una neurona dopaminérgica teñida con hematoxilina-eosina y que contiene un cuerpo de Lewy en su citoplasma. El cuerpo de Lewy es la inclusión intraneuronal redondeada con un halo y con un interior eosinófilo. La microfotografía en C muestra un cuerpo de Lewy teñido frente a α -sinucleína. [Modificado de (Mazzio y cols. 2011) (A) y de (Popescu y Lippa. 2004) (B)].

A día de hoy, no es posible identificar una única causa que origine la EP, y se sigue planteando si esta enfermedad es un conjunto heterogéneo de múltiples entidades con diferente etiopatogénesis (Jenner y Olanow. 2006). Se acepta que las principales causas de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la EP son: la disfunción mitocondrial, el aumento del estrés oxidativo, el mal funcionamiento de los sistemas de degradación de proteínas, la autofagia y la activación microglial crónica (Jenner y Olanow. 2006). Los agentes medioambientales (rotenona, paraquat, cobre y manganeso, MPTP, agonistas de calcio y neurolépticos) el envejecimiento y las alteraciones genéticas (α -sinucleína, Parkina, UCHL-1, LRRK2, PINK-1 y DJ-1) (Tabla 1) son factores etiopatogénicos con efectos aditivos y a veces sinérgicos.

Genes	Proteína	Herencia	Función	Referencias
PARK1 y PARK4	α -sinucleína	AD	¿Transporte vesicular?	(Polymeropoulos y cols. 1997)
PARK2	Parkina	AR	E3-ubiquitina ligasa	(Kitada y cols. 1998)
PARK7	DJ-1	AR	Chaperona, respuesta a estrés	(Bonifati y cols. 2003)
PARK6	PINK1	AR	Quinasa mitocondrial	(Valente y cols. 2004)
PARK5	UCHL1	AR	Ubiquitina hidrolasa	(Leroy y cols. 1998)
PARK8	LRRK2	AD	Quinasa citosólica	(Paisan-Ruiz y cols. 2004; Zimprich y cols. 2004)

Tabla 1. Principales genes relacionados con la EP.

1.2 Tratamiento

La administración del aminoácido 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA, levodopa) a finales de los años 60 del siglo XX representó el mayor avance terapéutico en el tratamiento de la EP (Cotzias y cols. 1967). Este tratamiento se basa en la inducción de la síntesis de DA a partir del precursor L-DOPA el cual se administra por vía oral en combinación o no con inhibidores del enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa periférico (L-AADC, DOPA descarboxilasa) (carbidopa), de la catecol-o-metil tranferasa (COMT) (entacapona) y de la monoaminooxidasa tipo B (MAO-B) (selegilina, rasagilina) para evitar la metabolización periférica de la L-DOPA o de la DA en el sistema nervioso central (SNC), potenciando así su farmacocinética. Sin embargo, aunque durante los primeros años de tratamiento se observa una mejora de la sintomatología de la EP, el tratamiento a largo plazo con este fármaco conduce a efectos no deseados como son las respuestas fluctuantes a la L-DOPA (fenómeno on-off) relacionadas con la concentración fluctuante de L-DOPA en plasma (Obeso y cols. 1989) y los efectos neuropsiquiátricos (alucinaciones, confusión y psicosis) (Lang y Lozano. 1998). Además, también se utilizan agonistas dopaminérgicos como la apomorfina y los agonistas no ergólicos para reemplazar a la DA en la activación de los receptores dopaminérgicos postsinápticos. El tratamiento quirúrgico mediante la estimulación cerebral profunda puede sortear parcialmente alguno de los problemas descritos, especialmente la estimulación del núcleo subtalámico, ya que se ha demostrado que esta intervención puede mejorar la función motora, las disquinesias y reducir el uso de medicamentos (Pahwa y cols. 2006). En general, los eventos adversos asociados a este tratamiento suelen ser relativamente infrecuentes. Aunque, como cualquier procedimiento neuroquirúrgico, éste lleva asociado ciertos tipos de riesgo como infecciones, hemorragias intracraneales y convulsiones. La estimulación cerebral profunda puede proporcionar alivio sintomático a largo plazo a determinadas clases de pacientes con EP. Sin embargo, este procedimiento no aminora la progresión de la enfermedad ni tiene naturaleza neuroreparadora (Kenney y cols. 2007).

Los factores neurotróficos son compuestos que fomentan la supervivencia y la diferenciación de determinados fenotipos neuronales y actualmente están considerados, junto con la terapia celular, como posibles agentes terapéuticos en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas como la EP (Bjorklund y Lindvall. 2000; Fernandez-Espejo. 2004; Krieglstein. 2004) ya que el tratamiento farmacológico actual y en algunos

casos mediante estimulación cerebral profunda, van perdiendo efectividad tras el paso de los años y produce los efectos adversos previamente comentados. Posteriormente abordaremos de manera más detallada estas posibles alternativas terapéuticas.

1.3 Modelos experimentales de EP inducidos por neurotoxinas

Los modelos experimentales son de gran utilidad para el estudio de la patogénesis de la EP en general y de las causas de la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en particular. Además, estos modelos facilitan el desarrollo de estrategias terapéuticas y el estudio de posibles tratamientos neuroprotectores (Orth y Tabrizi. 2003). Sin embargo, ningún modelo es totalmente equiparable a lo que representa la EP desde el punto de vista motor, histológico o neuroquímico, dado que los modelos por administración de neurotoxinas están principalmente orientados a inducir modificaciones estructurales y funcionales de la transmisión dopaminérgica nigroestriatal.

1.3.1 Modelo de 6-OHDA

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es un análogo hidroxilado del neurotransmisor DA y fue aislada por primera vez por Senoh y Witkop en 1959 (Senoh y cols. 1959; Senoh y Witkop. 1959). La primera evidencia de los efectos biológicos de la 6-OHDA fue notificada por Porter y colaboradores (Porter y cols. 1963) cuando observaron que este compuesto era capaz de inducir una depleción de noradrenalina a largo plazo en nervios del sistema nervioso simpático. Pocos años más tarde, se demostró que la inyección de 6-OHDA en la SNpc provocaba la degeneración anterógrada del sistema dopaminérgico nigroestriatal (Ungerstedt. 1968), generándose así el primer modelo animal de EP. El modelo de 6-OHDA ha sido usado extensamente desde entonces y todavía sigue siendo la herramienta más utilizada a la hora de reproducir una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc similar a la observada en la EP aunque esta neurotoxina no sea capaz de inducir la formación de cuerpos de Lewy.

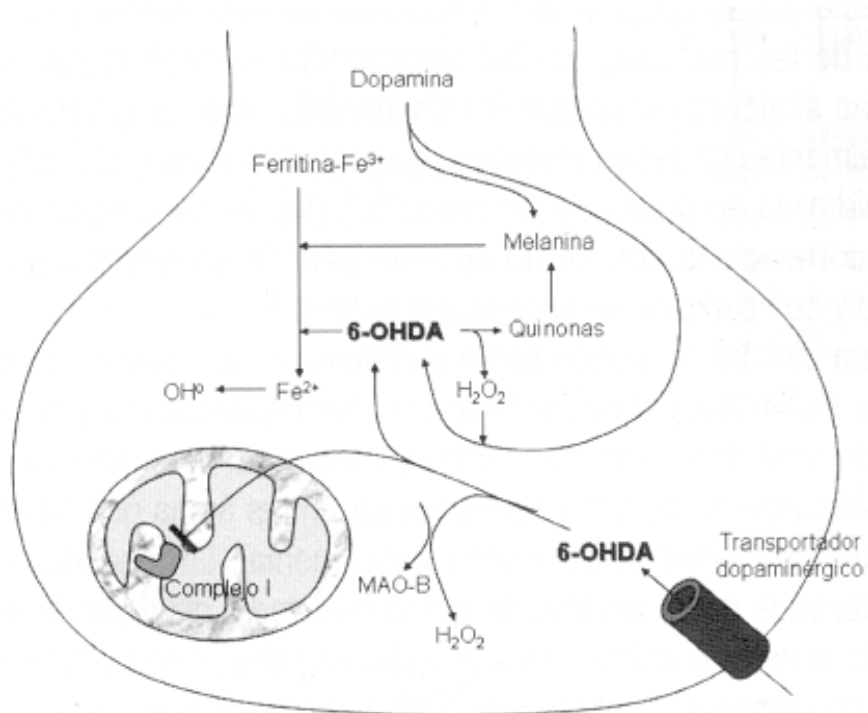


Figura 2. Esquema de un terminal dopaminérgico con el mecanismo de neurotoxicidad de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), utilizando el transportador de dopamina (DAT) para introducirse en el interior de la neurona para generar radicales libres e inhibir la actividad de la cadena de transporte electrones mediante el bloqueo del Complejo I. Modificado de (Herrero y Luquin. 2004).

El daño neuronal inducido por la 6-OHDA es debido principalmente al estrés oxidativo causado por esta toxina. Esta muerte neuronal está relacionada con la formación de radicales libres tipo hidroxilo (OH), quinonas y principalmente H₂O₂. La 6-OHDA, al igual que la dopamina, tiene gran afinidad por el transportador de dopamina (DAT), que transporta a la neurotoxina al interior de las neuronas dopaminérgicas y una vez dentro se desencadenan los procesos de autooxidación de la toxina (Figura 2) que dan lugar a la generación de los radicales libres anteriormente mencionados (Schober. 2004). Además, la 6-OHDA se puede acumular en la mitocondria y producir la inhibición de la actividad de la cadena de transporte electrones mediante el bloqueo del Complejo I (Schober. 2004).

La 6-OHDA, debido a que no atraviesa la barrera hematoencefálica, se suele inyectar en la SNpc y/o en el fascículo prosencefálico medial produciéndose una lesión rápida y masiva de los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas (Deumens y cols. 2002). La lesión se realiza normalmente de manera unilateral para poder utilizar el hemisferio contralateral como control (Figura 3). Las lesiones bilaterales producen una alta

tasa de mortalidad y normalmente no se utilizan para generar este tipo de modelos animales de EP (Ungerstedt. 1971). Existe una variante del procedimiento original de lesión que consiste en la administración de 6-OHDA en el estriado, estructura en la que se localizan los terminales de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Sauer y Oertel. 1994; Kirik y cols. 1998). Las lesiones parciales ocasionadas por la inyección intraestriatal de 6-OHDA generan un daño puntual en los terminales estriatales, seguido por una muerte progresiva y retrasada de las neuronas de la SNpc que se asemeja más a lo que acontece en la EP y por este motivo este modelo es muy usado a la hora de estudiar los efectos neuroregeneradores y neuroprotectores de determinadas sustancias y factores de crecimiento (Bjorklund y cols. 1997). La muerte neuronal en este modelo no parece estar vinculada a un transporte axonal retrógrado de la 6-OHDA sino que se la relaciona con una degeneración neuronal retrógrada secundaria a la lesión de los terminales dopaminérgicos estriatales (Sauer y Oertel. 1994).

Las lesiones unilaterales con 6-OHDA producen una alteración motora asimétrica denominada hemiparkinsonismo. Esta alteración es cuantificable mediante el análisis de la conducta rotacional inducida por la administración sistémica de apomorfina o amfetamina. La apomorfina es un agonista dopaminérgico que cuando se inyecta en animales con lesión nigroestriada unilateral, éstos presentan rotaciones contralaterales al lado lesionado (Figura 3) debido a la activación de los receptores de dopamina D1 y D2, ya que estos receptores postsinápticos del hemisferio con déficit de DA se regulan al alza tras la lesión (Schwartz y Huston. 1996). Sin embargo, la administración de amfetaminas incrementa la liberación de DA y disminuye su recaptación y degradación, por lo que la concentración de DA solo aumenta en el estriado sano, provocando rotaciones ipsilaterales a la lesión (Figura 3) en los animales hemiparkinsonianos (Deumens y cols. 2002).

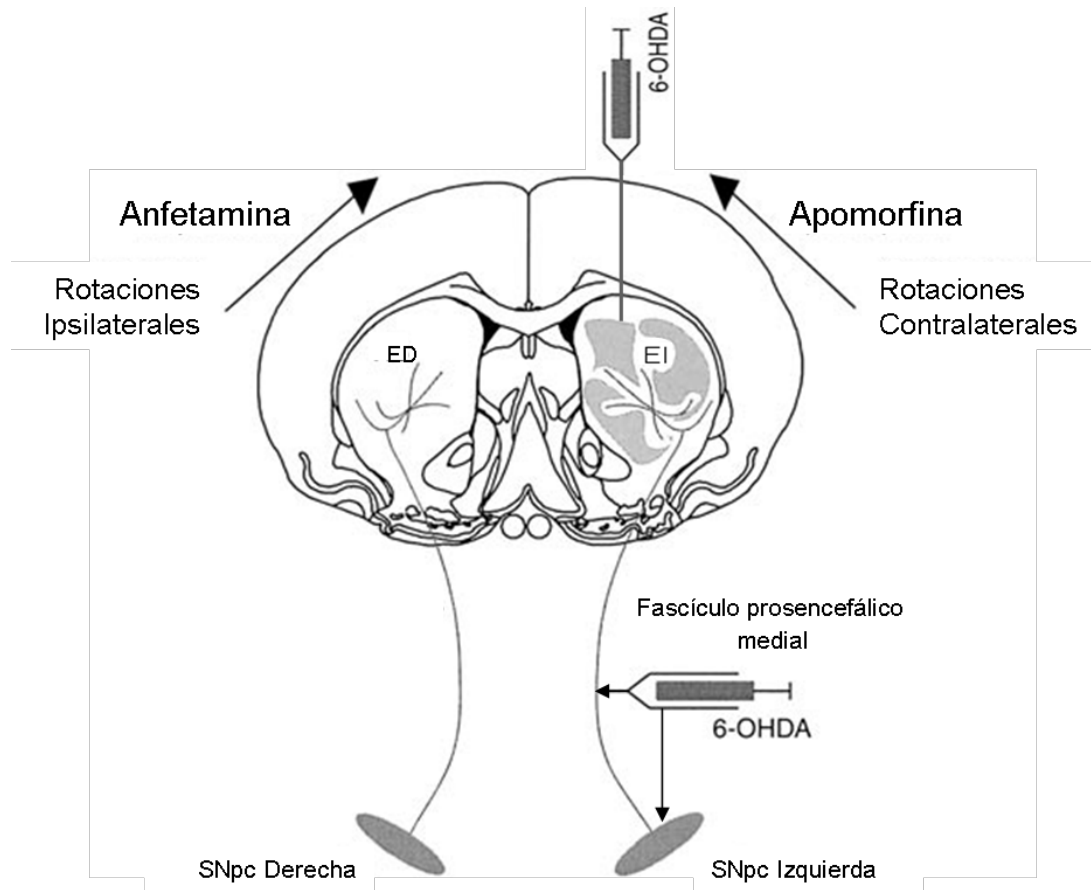


Figura 3. Diagrama de la vía nigroestriatal y de las respuestas rotacionales inducidas por apomorfina (Rotaciones Contralaterales) y por D-anfetamina (Rotaciones Ipsilaterales). Las áreas en gris en el estriado izquierdo indican la pérdida de DA debido a la inyección de 6-OHDA en la SN y/o en el fascículo prosencefálico medial o en el estriado. ED, estriado derecho; EI, estriado izquierdo; SNpc, Sustancia Negra *pars compacta*; 6-OHDA, 6-hidroxidopamina. Modificado de (Deumens y cols. 2002).

En resumen, la administración unilateral de 6-OHDA es una herramienta ampliamente utilizada a la hora de inducir lesiones nigroestriatales para generar modelos de EP. Este procedimiento tiene una complejidad y unos costes relativamente bajos. También hay que remarcar el hecho de que la lesión inducida con 6-OHDA es muy reproducible y el procedimiento es muy versátil ya que permite generar varios grados de lesión nigroestriatal con diferentes perfiles temporales dependiendo de la zona donde se inyecte la neurotoxina (Blandini y cols. 2008). En nuestro trabajo hemos optado, en primer lugar, por usar el modelo de lesión unilateral de la SNpc y del fascículo prosencefálico medial debido a la relativa rapidez con la que se alcanzan niveles de degeneración similares a los observados en los estadios finales de la EP. Por este motivo, este modelo se utiliza habitualmente para evaluar la eficacia de nuevas terapias farmacológicas y de reemplazo

celular (Hirsch y cols. 2003). Además, también hemos utilizado el modelo basado en la generación lesiones estriatales parciales con 6-OHDA ya que suele ser el de elección a la hora de llevar a cabo estrategias neuroprotectoras, debido a que la progresión de la neurodegeneración se aproxima mas a lo observado en la EP (Lee y cols. 1996).

1.3.2 Modelo de MPTP.

El parkinsonismo hallado en drogadictos y que fue generado por el consumo de drogas contaminadas con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Langston y cols. 1983) dió lugar al desarrollo de modelos en ratón y en primates de EP usando este inhibidor del Complejo I de la cadena de transporte de electrones como neurotoxina parkinsonizante (Bloem y cols. 1990).

El MPTP, una vez inyectado de manera sistémica, atraviesa la barrera hematoencefálica y es captado por la astrogliá y las neuronas serotoninérgicas donde es metabolizado a 1-metil-4-fenil,2,3-dihidropiridina (MPDP) por acción de la monoaminooxidasa B (MAO-B) (Singer y cols. 1987). Esta molécula se oxida espontáneamente generando 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP⁺) que se libera al espacio extracelular y es transportado, con mayor afinidad que la DA, al interior de la neurona dopaminérgica (Figura 4) a través de DAT (Javitch y Snyder. 1984). Una vez en el citoplasma, el MPP⁺ desencadena su acción neurotóxica mediante la interacción con las enzimas citosólicas generando radicales libres o bien se acumula en la mitocondria inhibiendo el Complejo I, generando en ambos casos la activación de caspasas que desemboca en la muerte de la neurona dopaminérgica (Ramsay y Singer. 1986; Adams y cols. 1993; Klaidman y cols. 1993). El MPP⁺ también puede ser acumulado en el interior de las vesículas sinápticas mediante la acción del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT-2) (Del Zompo y cols. 1993), hecho que protege a la mitocondria de los efectos neurotóxicos ejercidos por esta molécula (Liu y cols. 1992).

La administración de MPTP en primates no humanos causa temblor, rigidez, acinesia e inestabilidad postural, síntomas que son tratados con éxito mediante la administración de L-DOPA y agonistas dopaminérgicos. Las neuronas dopaminérgicas degeneran de manera selectiva en las áreas cerebrales, entre las que se incluye la SN, al igual que ocurre en la EP idiopática. Sin embargo, los modelos experimentales basados en

la administración aguda o subaguda de MPTP carecen de la formación de cuerpos de Lewy (Forno y cols. 1988).

El modelo de MPTP está ampliamente caracterizado y cumple con muchos de los criterios que definen a un buen modelo de EP, con la excepción de la ausencia de formación de cuerpos de Lewy (Orth y Tabrizi. 2003).

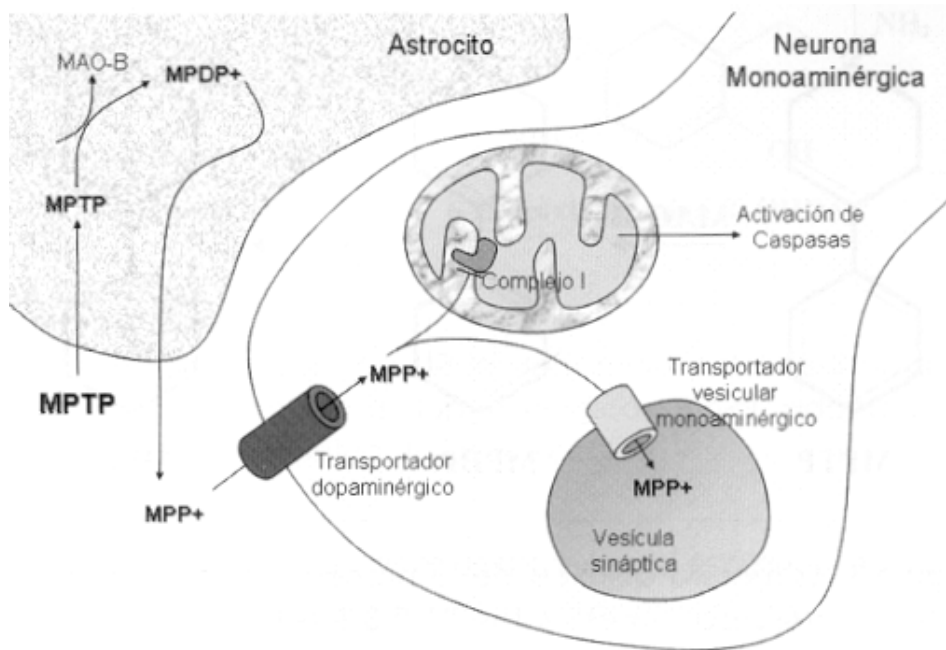


Figura 4. Esquema de la metabolización y la oxidación del MPTP a MPP⁺ en el astrocito y de su transporte al interior de la neurona dopaminérgica, donde ejerce su acción inhibitoria sobre el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y la consiguiente activación de la cascada de caspasas. Modificado de (Herrero y Luquin. 2004).

1.3.3 Modelo de Rotenona.

La rotenona es un compuesto natural con gran capacidad para inhibir el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Se obtiene a partir de las raíces de ciertas especies vegetales y se ha utilizado como pesticida en plantas, lagos y factorías de pescado. El modelo experimental por administración de rotenona que mejor reproduce parte de la sintomatología y de la neuropatología observada en la EP fue el desarrollado por Betarbet y colaboradores (Betarbet y cols. 2000). En este modelo la neurotoxina fue administrada a ratas por vía intravenosa ya que ésta es muy hidrófoba e insoluble en solventes acuosos.

Los animales infundidos con rotenona de manera crónica desarrollaron hipocinesia, inestabilidad postural, dificultad de la marcha y temblor en las extremidades. Estos efectos motores correlacionaron con la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales. Las neuronas afectadas por la acción de la rotenona mostraron inclusiones citoplasmáticas reactivas para α -sinucleína y ubiquitina que son similares a lo hallado en los cuerpos de Lewy.

Este modelo cumple con la mayoría de los criterios necesarios para ser un buen modelo de EP pero tiene el inconveniente de tener bastante variabilidad en la susceptibilidad individual de los animales a la toxina y por ello es de poca utilidad a la hora de probar tratamientos neuroprotectores (Beal. 2001).

2. FACTORES NEUOTRÓFICOS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Los factores neurotróficos son una clase de compuestos neuroprotectores, generalmente de naturaleza proteica, que son secretados por neuronas, glía y otros tipos celulares y que tienen la capacidad de promover el desarrollo y la supervivencia neuronal, el crecimiento axonal, la formación de sinapsis, la reinervación y la modulación de la función neuronal. En 1951, Levi-Montalcini y Hamburger caracterizaron el primer factor de crecimiento del sistema nervioso y lo denominaron factor de crecimiento nervioso (NGF) (Levi-Montalcini y Hamburger. 1951). Este hallazgo desencadenó el desarrollo de décadas de investigación que han dado lugar al descubrimiento y caracterización de diversos grupos de factores tróficos que ejercen diferentes acciones neurotróficas sobre poblaciones neuronales específicas (Hefti. 1994; Airaksinen y Saarma. 2002). Estos factores desempeñan un papel importante durante el desarrollo embrionario ya que están implicados en la diferenciación de los precursores neurales y en la determinación de las células que van a sobrevivir durante este proceso. Además, los factores neurotróficos regulan la migración y la localización final de las neuronas, la generación de conexiones durante el desarrollo y definen el fenotipo bioquímico, farmacológico y morfológico de estas células.

Por otro lado, se ha demostrado la existencia de incrementos en la concentración de varios factores neurotróficos y de sus respectivos receptores en respuesta al daño en el sistema nervioso central (Hughes y cols. 1999). Estos factores pueden actuar como agentes neuroprotectores sobre determinadas poblaciones neuronales que están afectadas de manera selectiva en las enfermedades neurodegenerativas y como moléculas protectoras frente al daño celular citotóxico. Debido a estas propiedades y a la ineficacia de las terapias convencionales actuales, varios factores neurotróficos podrían ser útiles en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas como la EP (Tabla 2). De este modo, nos centraremos en factores como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), neurturina y factores noveles como el factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos (MANF) y el factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF) ya que han sido utilizados como posibles agentes terapéuticos en varios modelos de EP, y algunos, incluso en ensayos clínicos.

Familia	FNs	Receptor/es	Efecto sobre las neuronas dopaminérgicas			
			<i>in vitro/in vivo</i>	Protector	Reparador	Estimulador
<u>GFLs</u>	GDNF	Ret / GFR α 1 y NCAM / GFR α 1	+/+	+	+	+
	NTN	Ret / GFR α 2 y NCAM / GFR α 2	+/+	+	+	+
	PSPN	Ret / GFR α 3	+/+	+	SD	+
	ARTN	Ret / GFR α 4	+/+	+	SD	+
<u>FNs Noveles</u>	CDNF	Desconocido	+/+	+	+	SD
	MANF	Desconocido	+/+	+	+	SD
<u>Neurotrofinas</u>	NGF	TrkA y p75NTR	+/+	+	SD	+
	BDNF	TrkB y p75NTR	+/+	+	SD	+
	NT-3	TrkC y p75NTR	+/+	SD	+	SD
	NT-4	TrkB y p75NTR	+/+	+	SD	+
<u>Neuroquinas</u>	CNTF	gp130, LIFR β y CNTFR α	+/+	+	SD	SD
	LIF	gp130 y LIFR β	+ / SD	SD	SD	SD
	IL-6	gp130 y IL6R α	+ / SD	SD	SD	SD
	CT-1	gp130 y LIFR β	+ / SD	SD	SD	SD
	OSM	gp130 y OSMR α	SD / SD	SD	SD	SD
<u>Otros</u>	TGF- β	TGFR1-3	+/+	+	SD	+
	FGFb	FGFR1-4	+/+	+	SD	+

Tabla 2. Efecto de los Factores Neurotróficos sobre las neuronas dopaminérgicas.

Factores Neurotróficos (FNs) no mencionados en el texto principal: PSPN (Persefina), ARTN (Artemina), NT-3 (Neurotrofina-3), NT-4 (Neurotrofina-4), CNTF (Factor neurotrófico ciliar), LIF (Factor inhibidor de la leucemia), IL-6 (Interleuquina-6), CT-1 (Cardiotrofina-1), OSM (Oncostatina-M), TGF- β (Factor transformante de crecimiento β) y FGFb (Factor de crecimiento de fibroblastos básico). *Claves:* (+, sí) y (SD, sin determinar). Tabla modificada de (Aron y Klein. 2011).

A parte de los FNs mencionados en la tabla 2, también existen otros factores que ejercen efectos sobre las neuronas dopaminérgicas: IGF-1 (Factor de crecimiento insulínico tipo 1), EGF (Factor de crecimiento epidérmico), VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular), VIP (Péptido intestinal vasoactivo), EPO (Eritropoyetina), SHH (Erizo Sonic) y BMPs (Proteínas morfogénicas óseas).

2.1 BDNF

El factor neurotrófico derivado del cerebro pertenece a la familia de las neurotrofinas y fue aislado por primera vez en 1982 a partir de extractos del cerebro del cerdo (Barde y cols. 1982). El BDNF fue la primera neurotrofina que se aisló después del hallazgo del NGF, descubriéndose que no solo era capaz de facilitar la supervivencia de las neuronas sino que también promovía el crecimiento de las fibras nerviosas. El gen del BDNF se localiza en el cromosoma 11 (Jones y Reichardt. 1990) y codifica para una gran

prepromolécula con un péptido señal secretorio que posibilita la constitución del BDNF como un factor extracelular. La señalización mediada por BDNF tiene lugar a través de dos clases de receptores (Patapoutian y Reichardt. 2001; Reichardt. 2006): 1) el receptor tirosina quinasa B (TrkB), a través del cual el BDNF activa a Ras, a la fosfatidil inositol-3 (PI3)-quinasa, a la fosfolipasa C y como consecuencia a las MAP quinasas; 2) el receptor de NGF de baja afinidad (LNGFR ó p75), mediante el cual este factor activa al factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y a la quinasa Jun. El ARNm del BDNF se expresa ampliamente en la SN (Yan y cols. 1997a), mientras que su receptor TrkB se expresa en el estriado y en la SN (Yan y cols. 1997b). Sin embargo, los niveles de BDNF y de su ARNm se hallan regulados a la baja en la SN de los pacientes parkinsonianos, lo que sugiere la posible relación entre los niveles reducidos de este factor y la EP (Mogi y cols. 1999; Parain y cols. 1999; Howells y cols. 2000).

Varios estudios han demostrado la capacidad del BDNF para proteger *in vitro* a las neuronas dopaminérgicas de los efectos neurotóxicos del MPP⁺ y de la 6-OHDA (Hyman y cols. 1991; Spina y cols. 1992). La infusión de BDNF en la SN, previamente o de manera posterior al daño nigroestriatal, fue capaz de mejorar la conducta rotacional y el déficit neuroquímico por medio de la atenuación de la neurodegeneración dopaminérgica o bien por la potenciación de la función de las neuronas dopaminérgicas supervivientes (Altar y cols. 1992). Además, la administración intraestriatal de BDNF previa a la lesión con 6-OHDA, en un modelo de EP en rata, redujo la destrucción de las neuronas dopaminérgicas en la SN y el número de rotaciones inducidas por la apomorfina (Shults y cols. 1995). Sin embargo, la infusión de BDNF en la SN no fue capaz de prevenir la degeneración provocada tras la lesión del fascículo prosencefálico medial (Lapchak y cols. 1993). Por otro lado, el implante de fibroblastos modificados genéticamente para producir BDNF, en el estriado de ratas posteriormente lesionadas con 6-OHDA, protegió completamente a las neuronas de la SN y salvaguardó de manera parcial a las fibras estriatales (Levivier y cols. 1995). Los fibroblastos con capacidad para secretar BDNF implantados en la SN, también fueron capaces de proteger de la degeneración a las neuronas dopaminérgicas nigrales en un modelo de EP en rata por administración de MPTP posterior al implante (Frim y cols. 1994). El estudio de los efectos del BDNF en los primates no humanos ha sido llevado a cabo mediante el uso de monos lesionados con MPTP. La administración previa de este factor retrasó y redujo la gravedad del parkinsonismo inducido por MPTP y proporcionó una significativa neuroprotección a las

neuronas dopaminérgicas de la SN en comparación con lo hallado en los animales control (Tsukahara y cols. 1995).

Los estudios de los efectos del tratamiento neuroprotector con BDNF en modelos animales de EP revelan que este factor es parcialmente efectivo a la hora de mejorar el déficit motor y de proteger a las neuronas dopaminérgicas, pero no tienen carácter neuroreparador y son demasiado limitados e insuficientes para fomentar el uso de este factor en futuros ensayos clínicos.

2.2 GDNF

El factor neurotrófico derivado de la glía está incluido dentro de un grupo de proteínas relacionadas entre sí, denominado como ligandos de la familia del GDNF (GFLs). En esta familia también se hallan incluidos otros factores tróficos como neurturina, artemina y persefina. El GDNF fomenta la supervivencia de diferentes poblaciones neuronales, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. En 1993 este factor fue purificado, y en ese mismo año se descubrió su potencial terapéutico en la EP, ya que se demostró su capacidad para promover el crecimiento y la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas embrionarias del mesencéfalo (Lin y cols. 1993). La unión del GDNF con el receptor alfa 1 de la familia del GDNF (GFR α 1) produce la activación de una tirosina quinasa denominada c-Ret, e induce la activación de múltiples vías de señalización entre las que se incluyen la vía de las MAP quinasas y la mediada por la fosfolipasa C γ . El GDNF también genera respuestas mediante mecanismos independientes de c-Ret (Sariola y Saarma. 2003). Los niveles de GDNF total en las regiones dopaminérgicas no difieren entre los pacientes con EP y los controles (Mogi y cols. 2001). Sin embargo, Beckman y colaboradores demostraron la existencia de una significativa regulación al alza de los niveles de ARNm de GDNF en el putamen de enfermos de Parkinson que tenían una destacable pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN, en comparación con los pacientes control. Por el contrario, no hallaron cambios significativos en la expresión de las subunidades del sistema de receptores del factor (Backman y cols. 2006).

Muchos de los estudios iniciales con GDNF en modelos animales de EP fueron realizados utilizando el modelo por lesión con 6-OHDA. La inyección de este factor en el

estriado de ratas con lesiones estriatales protegió a las neuronas dopaminérgicas de la SN (Kearns y Gash. 1995). En otro trabajo, la administración de GDNF en una región superior próxima a la SN, una semana después de la lesión, protegió parcialmente de la degeneración a las neuronas TH⁺ de la SN (Sauer y cols. 1995). Sin embargo, varias de las neuronas que sobrevivieron mostraron una atrofia significativa, lo que indicó que la administración en sitios próximos a la zona lesionada, en lugar de hacerlo directamente en la estructura de interés, es menos efectivo a la hora de obtener efectos neuroprotectores. Un estudio muy relevante comparó los beneficios a nivel celular y a nivel motor de la administración de GDNF, previa a la lesión con 6-OHDA, en el estriado, en la SN o en el ventrículo lateral (Kirik y cols. 2000a). La administración de factor en el estriado produjo neuroprotección tanto en los cuerpos celulares de la SN como en las fibras estriatales TH⁺ y preservó la función motora. La elección de la zona de administración del GDNF fue muy relevante a la hora de determinar el nivel de efectividad, ya que las inyecciones estriatales del factor ejercieron un efecto neuroprotector mas marcado que las que se realizaron en la SN o en el ventrículo lateral.

El tratamiento con GDNF en bolo o mediante infusión constante y a través de tres rutas de administración (intranigral, intraestriatal e intracerebroventricular), mejoró síntomas como la bradicinesia, rigidez y la inestabilidad postural en monos lesionados con MPTP (Gash y cols. 1996; Zhang y cols. 1997; Grondin y cols. 2002). Además, también se observó un ligero aumento en la densidad de fibras TH⁺ en el estriado. La densidad de estas fibras fue mas pronunciada en el área que rodeaba a la zona de infusión, lo que indicó que la neuroprotección asociada al GDNF correlacionó directamente con los niveles de expresión del factor. Los resultados de estos estudios en primates no humanos estimularon el inicio de ensayos clínicos con GDNF en pacientes con EP. Los datos de dos ensayos clínicos abiertos (Gill y cols. 2003; Slevin y cols. 2005), en los que el factor fue infundido directamente en el putamen, sugirieron que el GDNF era capaz de mejorar algunos síntomas motores y de restaurar parcialmente la vía nigroestriatal (dato obtenido mediante el estudio de la captación del trazador ¹⁸F-Dopa). Además, el análisis postmortem de uno de los pacientes reveló que el GDNF estimuló el crecimiento axonal de las neuronas dopaminérgicas que inervan el putamen (Love y cols. 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos en el primer ensayo doble ciego fueron negativos (Lang y cols. 2006) si se comparan con lo observado en los dos estudios abiertos anteriormente mencionados. En este estudio doble ciego, se llevó a cabo una infusión directa de GDNF pero empleándose

una dosis menor y un catéter mas ancho que en los ensayos previos. No se observaron mejorías de los síntomas motores y algunos pacientes generaron anticuerpos frente a GDNF. Estudios paralelos de seguridad realizados en primates no humanos indicaron, por razones desconocidas, la asociación de la infusión de GDNF en el putamen con la aparición de lesiones en el cerebelo (Sherer y cols. 2006). La ausencia de eficacia clínica y los resultados adversos observados tanto en los pacientes como en los primates no humanos provocaron el abandono de la estrategia de infusión de GDNF en los ensayos clínicos. Por lo tanto, es preciso revisar los problemas relacionados con la seguridad y la forma de administración del factor, mediante la realización de mas estudios en modelos animales, antes de llevar a acabo futuros ensayos clínicos en los que se vaya a infundir GDNF en pacientes.

Por otro lado, la terapia celular *ex vivo* y la terapia génica *in vivo* son dos técnicas alternativas a la hora de administrar GDNF a las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal. La terapia celular *ex vivo* consiste en realizar implantes en el estriado o en la SN de células modificadas genéticamente para expresar GDNF. Existen varios trabajos que ponen de manifiesto los efectos beneficiosos de los implantes, en modelos animales de EP, de diferentes líneas celulares encapsuladas que producen GDNF (Lindner y cols. 1995; Date y cols. 2001; Yasuhara y cols. 2005). Otros grupos también han obtenido resultados positivos en modelos animales de EP mediante la utilización de células productoras de GDNF procedentes de cultivos primarios, tales como astrocitos (Ericson y cols. 2005), células de la médula ósea (Park y cols. 2001) y células madre neurales (Akerud y cols. 2001; Behrstock y cols. 2006). El futuro de la terapia celular *ex vivo* en la EP es incierto debido a la controversia derivada de los resultados adversos obtenidos en los ensayos clínicos con GDNF anteriormente comentados. La segunda estrategia para aportar GDNF *in vivo* de manera continuada al sistema nigroestriatal se basa en la terapia génica. De este modo, se han utilizado vectores virales como los adenovirus (Bilang-Bleuel y cols. 1997; Lapchak y cols. 1997), virus adeno-asociados (AAV) (Mandel y cols. 1997; Kirik y cols. 2000b), herpesvirus (Monville y cols. 2004) y lentivirus (Bensadoun y cols. 2000; Kordower y cols. 2000) para expresar GDNF en el estriado o la SN de modelos animales de EP, obteniéndose resultados alentadores. A pesar de los efectos beneficiosos de esta estrategia en modelos de EP, todavía no se han iniciado los ensayos clínicos necesarios para probar la eficacia en pacientes del tratamiento con vectores virales que portan el gen del GDNF.

2.3 Neurturina

La neurturina (NTN) es un análogo estructural y funcional del GDNF que forma parte de los ligandos de la familia del GDNF (GFLs). Esta proteína de origen natural se une con mayor afinidad al receptor $GFR\alpha 2$ el cual está asociado a c-Ret e induce la activación de las vías de señalización mediadas por las MAPKs y por PI3K (Creedon y cols. 1997).

Estudios *in vitro* y en modelos animales de EP han puesto de manifiesto la capacidad de la neurturina para estimular la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas (Horger y cols. 1998; Rosenblad y cols. 1999; Li y cols. 2003). La administración intraestriatal de NTN en ratas, antes de la lesión con 6-OHDA, protegió de la neurodegeneración a las neuronas dopaminérgicas de la SN e incrementó los niveles de dopamina estriatales (Oiwa y cols. 2002). Este efecto neuroprotector no fue observado cuando la administración de NTN tuvo lugar después de la lesión con la neurotoxina, aunque si se hallaron evidencias de crecimiento de los terminales dopaminérgicos estriatales. La infusión intraputamina de NTN en monos lesionados con MPTP mejoró la función motora e incrementó los niveles de metabolitos de la dopamina en el globo pálido (Grondin y cols. 2008).

Debido al éxito en modelos de EP de la aplicación de un vector basado en un AAV que contenía el gen de la NTN humana (CERE-120) (Kordower y cols. 2006; Gasmi y cols. 2007), la empresa Ceregene Inc. inició el primer ensayo clínico abierto con CERE-120 en enfermos de EP. Los resultados de este estudio revelaron una significativa reducción en los síntomas de la enfermedad a la par que no se observaron efectos secundarios adversos (Marks y cols. 2008). A continuación, se llevó a cabo un ensayo clínico doble ciego Fase II que no proporcionó los resultados beneficiosos observados en el primer estudio (Marks y cols. 2010). Además, el estudio postmortem reveló que la ausencia de mejoría observada pudo ser debida a la pobre difusión de la NTN en el tejido (Marks y cols. 2010; Vastag. 2010).

2.4 MANF y CDFN

El factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos (MANF) fue descubierto e identificado en el medio condicionado de una línea celular de astrocitos procedentes del mesencéfalo ventral (Petrova y cols. 2003). Esta proteína de 20 KDa es capaz de incrementar la tasa de supervivencia de las neuronas en cultivo positivas para TH y la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2) (Petrova y cols. 2003) y actualmente forma parte de una nueva clase de moléculas que promueven la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas. En 2007, el factor neurotrófico de dopamina conservado (CDFN) fue identificado y caracterizado mediante métodos bioinformáticos y bioquímicos (Lindholm y cols. 2007). Este factor es un homólogo muy próximo a MANF y se expresa tanto en células no neuronales como en neuronas de varias regiones cerebrales. Los genes que codifican para estos dos factores están altamente conservados a lo largo de la evolución. Los receptores que median en la acción de ambos factores aún no han sido descubiertos.

El estudio de los efectos de la administración de MANF (Voutilainen y cols. 2009) y CDFN (Lindholm y cols. 2007) en el modelo de EP por lesión con 6-OHDA, revelaron que la inyección intraestriatal de cada uno de estos factores, previa a la lesión con la neurotoxina, fue capaz de reducir el comportamineto rotacional inducido por apomorfina y protegió tanto a las neuronas dopaminérgicas de la SN como a los terminales TH+ estriatales. Además, cuando la administración de CDFN o MANF fue realizada 4 semanas después de la lesión, también se observó una recuperación de la función motora. Este hecho sugiere la capacidad de estos factores tanto para prevenir el avance de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas como para mantener o incrementar la función de las neuronas que no degeneraron tras la lesión con 6-OHDA.

CDFN y MANF son dos proteínas noveles en el tratamiento de la EP que tienen la capacidad para proteger y reparar a las neuronas y a los terminales del sistema nigroestriatal en modelos animales de EP. Estudios futuros tendrán que dilucidar el mecanismo de acción de estos factores y su posible utilización en ensayos clínicos.

3. LIVER GROWTH FACTOR. (Factor de Crecimiento de Hígado).

Los tratamientos farmacológicos y quirúrgicos convencionales frente a la EP dejan de ser efectivos a lo largo del tiempo ya que no frenan el avance de la enfermedad. Sin embargo, los factores tróficos están siendo considerados como una prometedora herramienta en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas debido a su potencial neuroprotector y neurorreparador. Por estos motivos, decidimos evaluar la capacidad terapéutica de un compuesto novel con efectos pleiotrópicos, denominado Factor de Crecimiento de Hígado, en el modelo experimental de EP por lesión con 6-OHDA.

1.1 Antecedentes

El hígado es uno de los órganos con mayor capacidad de regeneración. Las ratas recuperan en torno al 66% del peso total del hígado en el plazo de 8 a 10 días después de haber sido sometidas a una hepatectomía parcial del 70% (Bucher y Malt. 1971). Entre los diversos mecanismos que se han propuesto a la hora de explicar esta gran capacidad de regeneración del hígado, destaca la presencia de uno o varios factores tróficos en el suero de animales con hepatectomía parcial, dichos factores son responsables de las extraordinarias tasas de proliferación celular hepática observadas. Durante los años 60 y 70, varios autores realizaron trabajos tanto *in vivo* como *in vitro* para demostrar la existencia, en la sangre de animales hepatomizados, de una actividad asociada a un factor o factores implicados en el crecimiento hepático. Paul y colaboradores, mediante experimentos de captación de [³H] timidina, hallaron un incremento en la síntesis de ADN en cultivos de células de hígado fetal de rata que habían crecido en presencia de suero procedente de ratas parcialmente hepatomizadas en comparación con lo hallado en los cultivos incubados con suero de ratas sanas (Paul y cols. 1972). Además, Moolten y Bucher, en experimentos de circulación cruzada entre ratas parcialmente hepatomizadas y ratas normales, observaron un aumento de la síntesis de ADN y de proteínas en el hígado de los animales sanos (Moolten y Bucher. 1967). Fisher y colaboradores demostraron que el factor humoral implicado en la regeneración hepática se hallaba en la sangre de la vena porta y que su concentración incrementaba en función de la cantidad de hígado que se hubiese extirpado durante la hepatectomía (Fisher y cols. 1971).

Tras varios intentos para intentar purificar este factor de crecimiento realizados en suero (Morley y Kingdon. 1973), en plasma (Goldberg y cols. 1980), en extractos citoplasmáticos de hígado (LaBrecque y Bachur. 1982) y en plaquetas (Russell y cols. 1984), en 1986 Díaz-Gil y colaboradores consiguieron purificar del plasma procedente de ratas parcialmente hepatizadas una molécula de 64 KDa, que inyectada en ratones fue capaz de estimular la síntesis de ADN en el hígado y de incrementar el índice mitótico de los hepatocitos. Además, la administración de esta molécula purificada, en cultivos primarios de células hepáticas de rata, promovió la síntesis de ADN, la actividad del sistema A de transporte de aminoácidos e incrementó la captación de $^{22}\text{Na}^+$ (Díaz-Gil y cols. 1986a). A este factor se le denominó *Liver Growth Factor* (LGF) (Factor de crecimiento de Hígado).

El LGF solo es detectable en el suero tanto de ratas como de humanos cuando previamente se ha producido un daño hepático o hepato-biliar (Díaz-Gil y cols. 1986a; Díaz-Gil y cols. 1986b; Díaz-Gil y cols. 1988; Díaz-Gil y cols. 1989). El LGF purificado a partir de suero de humanos con hepatitis tipo B muestra características casi idénticas al obtenido a partir de suero de ratas (Díaz-Gil y cols. 1989). Además, las propiedades del factor son idénticas cuando es obtenido a partir del suero de cerdos con trasplante hepático (Díaz-Gil y cols. 1992).

1.2 Naturaleza química del LGF

La estructura química del LGF fue definida como un complejo albúmina-bilirrubina, después de un estudio de espectros de absorción, fluorescencia, dicroísmo celular, mapas trópticos, composición de aminoácidos, movilidad electroforética, inmunofluorescencia, formación de complejos albúmina-bilirrubina *in vitro*, estudio de la actividad biológica tanto *in vivo*, como *in vitro* e identificación por HPLC (Díaz-Gil y cols. 1987a). Para demostrar que el LGF era un complejo seroalbúmina-bilirrubina, Díaz-Gil y colaboradores sintetizaron *in vitro* complejos albúmina-bilirrubina y demostraron que cuando se incubaba bilirrubina con albúmina se formaba un complejo que ejercía la actividad biológica característica del LGF. En cambio, la albúmina o la bilirrubina por sí mismas no presentaban actividad mitótica en el hígado de ratones al ser administradas de manera independiente (Díaz-Gil y cols. 1987a). La aparición de actividad biológica del

complejo albúmina-bilirrubina parece ligada a un cambio de conformación en la albúmina provocada por el enlace covalente de la bilirrubina (Díaz-Gil y cols. 1988). Además, otros autores (Abakumova y cols. 1994) han corroborado la actividad de complejos albúmina-bilirrubina como factores de crecimiento hepáticos.

1.3 Efectos biológicos del LGF

El efecto más característico de este factor es el de actuar como un mitógeno hepático. Cuando el LGF es inyectado a ratas o ratones tiene actividad *in vivo* como factor de crecimiento, incrementando la síntesis de ADN de hígado, el peso seco del hígado, el número de células positivas para el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), produciendo una hiperplasia transitoria sin que se detecten efectos agresivos, ni inmediatos ni permanentes, es decir, sin producción de fibrosis, amiloides, ni perturbaciones mitocondriales ni nucleares (Díaz-Gil y cols. 1994). La acción del LGF a largo plazo no parece perturbar la homeostasis, puesto que un año después de la inyección de LGF, el hígado, el páncreas, los riñones y el bazo no mostraron signos de degeneración o de fibrosis (Díaz-Gil y cols. 1994).

El LGF es capaz de estimular la regeneración del hígado dañado por la acción de diversas hepatotoxinas (Díaz-Gil y cols. 1994b; Díaz-Gil y cols. 1999). En un modelo de cirrosis por CCl₄, una vez alcanzada una situación irreversible, la inyección del LGF fue capaz de disminuir la fibrosis, produciendo una reestructuración sustancial del parénquima hepático, mejora de la inflamación y de la necrosis, aumento de la funcionalidad hepática y la recuperación de diversas funciones hemodinámicas (presión portal, presión arterial, *shunting* portosistémico y resistencia vascular sistémica), así como la reducción de la ascitis. En otro modelo de cirrosis-fibrosis por ligadura del conducto biliar en ratas, la inyección del LGF en diferentes estadios del modelo demostró producir una disminución sustancial de la fibrosis y cirrosis y mejora funcional del hígado en diversos tests (Díaz-Gil y cols. 2008, 2009). Asimismo se mostró que la actividad antifibrótica del LGF puede ser ejercida mediante la modulación del estado de activación de las células estrelladas hepáticas y de los miofibroblastos (Díaz-Gil y cols. 2009) y por la inhibición de la síntesis de determinados mediadores fibrogénicos tales como el factor transformante de

crecimiento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y las metaloproteasas de la matriz 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) (Díaz-Gil y cols. 2008).

El LGF también tiene la capacidad para reducir la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas, produciendo una disminución de la fibrosis en la arteria carótida y aumentando el número de células de la musculatura lisa vascular pero sin alterar el diámetro interno o el espesor medio de dicha arteria (Somoza y cols. 2006). Además, dos estudios recientes (Conde y cols. 2011; Condezo-Hoyos y cols. 2012) han demostrado que el tratamiento con LGF, en este modelo de hipertensión arterial, produce los siguientes efectos regenerativos a nivel cardiovascular: 1) Restaura la composición de la pared de los vasos intramiocardiales, 2) reduce la hipertrofia del ventrículo izquierdo, 3) mejora la disponibilidad de óxido nítrico (NO) mediante la reducción de los niveles del anión superóxido y 4) normaliza los niveles plasmáticos de varios marcadores de stress oxidativo. El LGF también posee una notable actividad antioxidante *in vitro* ya que se ha demostrado su efectividad como secuestrador de varias especies reactivas de oxígeno implicadas en patología cardiovascular (Condezo-Hoyos y cols. 2009). Recientemente se ha puesto de manifiesto la capacidad del LGF para disminuir la esteatosis hepática y la placa de ateroma, en un modelo de ratones con aterosclerosis (Surra y cols. 2010).

Varios trabajos han mostrado el papel del LGF en el campo de la regeneración testicular. La administración de LGF, en ratas con deplección de las células de Leydig por tratamiento con EDS (Etano dimetanosulfonato), estimula la regeneración testicular, previene el desprendimiento de las células germinales y del daño a las células de Sertoli, promueve el crecimiento de las células germinales y estimula la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de sus receptores (Martín-Hidalgo y cols. 2007a; Martín-Hidalgo y cols. 2007b). Además, el LGF también es capaz de mejorar la regeneración testicular y de recuperar la espermatogénesis en ratones tratados con bisulfan, un agente que destruye selectivamente las células madre espermatogoniales (Perez-Crespo y cols. 2011).

Por último, un estudio reciente muestra que la administración de LGF, en un modelo de fibrosis pulmonar inducida por CdCl_2 , mejora la función pulmonar y es capaz de revertir parcialmente tanto la fibrosis pulmonar como el incremento de las proteínas de la matriz pulmonar (Martínez-Galan y cols. 2010).

En resumen, el LGF es un factor pleiotrópico, caracterizado químicamente como un complejo albúmina-bilirrubina, capaz de estimular la proliferación celular y la regeneración tisular en diferentes patologías tanto hepáticas como extrahepáticas.

1.4 Mecanismos y células implicadas en la acción del LGF

Al contrario de lo descrito en el apartado 2 de esta introducción sobre la mayoría de los factores neurotróficos, a día de hoy, no se conocen los mecanismos de acción fundamentales (receptores, vías de señalización) ni las células mediadoras específicas implicadas en la acción del LGF tanto en tejidos hepáticos como extrahepáticos. Los trabajos realizados hasta la fecha muestran que la acción mitogénica ejercida en el hígado por el LGF puede estar mediada, al menos en parte, por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Díaz-Gil y cols. 2003), ya que el LGF produce la regulación al alza de esta citoquina, actuando sobre las células endoteliales de la vena porta. Además, el LGF también estimula la secreción de TNF- α en cultivos de células endoteliales humanas (HUVEC). Esta secreción es del orden de pg/ml, al contrario de lo que se produce en los procesos inflamatorios donde las secreciones de TNF- α son mayores. De hecho, los efectos del LGF en HUVEC mediados por TNF- α no incrementan la expresión de las moléculas de adhesión endotelial ICAM-1 (Molécula de adhesión intercelular 1) y VCAM-1 (Molécula de adhesión de células vasculares 1), las cuales juegan un papel clave en los efectos proinflamatorios mediados por esta citoquina (Díaz-Gil y cols. 2003). También, hay que destacar que una serie de experimentos preliminares han mostrado la capacidad del LGF para inducir la liberación de TNF- α en cultivos de monocitos humanos (Díaz-Gil, comunicación personal). Debido a que la microglía se origina a partir de la invasión de los monocitos durante el desarrollo del sistema nervioso (Ling y Wong. 1993), durante el desarrollo del presente trabajo incluiremos a este fenotipo como una de las posibles células diana de la acción de LGF, sin descartar al resto de tipos celulares del SNC. Además intentaremos abordar el estudio de las posibles vías de señalización que median en la acción del LGF ya que es fundamental tener el mayor conocimiento posible sobre los mecanismos mediante los cuales actúan los factores tróficos.

4. TERAPIA CON CÉLULAS MADRE EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

4.1. Neurogénesis en el Sistema Nervioso Central adulto.

Las células madre neurales (CMN) se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y de generación de todos los linajes de células neurales (multipotencialidad) (Gage. 2000; Pluchino y cols. 2005; Merkle y Alvarez-Buylla. 2006). En el SNC adulto de los mamíferos, la mayor población de CMN se localiza en el área periventricular, extendiéndose a través del neuroeje que discurre desde el cerebro anterior hasta la médula espinal (Temple y Alvarez-Buylla. 1999). La producción bajo condiciones fisiológicas de neuronas *de novo* (neurogénesis) en los mamíferos adultos, tiene lugar fundamentalmente en las zonas subventriculares (ZSV) y en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (Alvarez-Buylla y Lim. 2004). También se han identificado células progenitoras en la sustancia negra del adulto, que son capaces de generar células gliales *in situ* o neuronas si se cultivan *in vitro* (Lie y cols. 2002).

La ZSV se extiende a lo largo de las paredes laterales de los ventrículos laterales y alberga el mayor reservorio de células en proliferación del cerebro de la mayoría de los mamíferos adultos, incluidos los humanos. En la ZSV se hallan contenidas cuatro tipos principales de células (Alvarez-Buylla y Lim. 2004): Las células endimarias multiciliadas (células tipo E) que separan el lumen del ventrículo del parénquima cerebral e intervienen en la circulación del líquido cefalorraquídeo. Las CMN (células tipo B) muestran características similares a los astrocitos como la expresión de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) y tienen una tasa de proliferación poco elevada. Las células tipo B generan células de rápida proliferación (células tipo C), también denominadas como progenitores transitorios amplificativos, que a su vez dan lugar a neuroblastos con capacidad de migración (células tipo A). Las células tipo A migran a través de la vía rostral migratoria (VRM) hacia el bulbo olfatorio (Ming y Song. 2005), donde se diferencian en dos tipos de interneuronas: las células granulares y las células periglomerulares (Figura 5A). Este proceso también tiene lugar en el cerebro humano (Curtis y cols. 2007). Entre un 1% y un 25% de las células tipo A dan lugar a neuronas periglomerulares que expresan GABA (ácido γ -amino-butírico) o TH, mientras que entre un 75% y un 99% se diferencian a células granulares GABAérgicas. Cada uno de los tipos de células progenitoras

anteriormente descritas pueden ser distinguidos mediante el estudio de su patrón de expresión de determinados marcadores moleculares (Figura 5B) (Ming y Song, 2005).

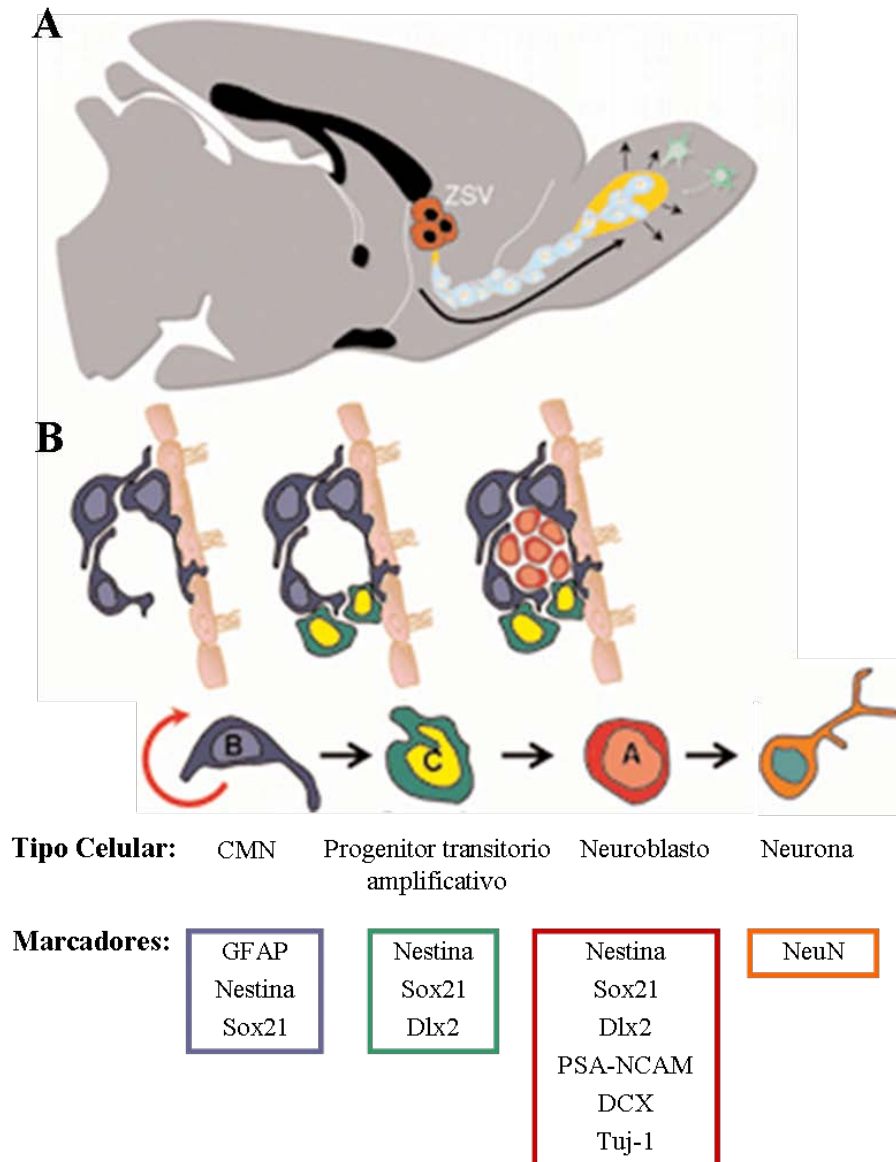


Figura 5. Neurogénesis en la Zona Subventricular de la rata adulta. En A se muestra la sección sagital del cerebro adulto, donde se observan las células progenitoras neuronales en la ZSV y su migración hacia el bulbo olfatorio donde se diferencian a neuronas granulares y periglomerulares. En B se representan los diferentes tipos celulares que componen el linaje neuronal junto con sus marcadores específicos. ZSV, Zona Subventricular. Modificado de (Arias-Carrión y cols. 2007).

4.2. Estimulación de la neurogénesis adulta en la EP.

Una estrategia terapéutica a la hora de abordar el tratamiento de la EP se basa en la estimulación *in vivo* de la neurogénesis en el cerebro adulto mediante la administración de factores neurotróficos. De este modo, el objetivo de esta terapia consiste en promover la migración y la diferenciación de las células de la zona subventricular hacia neuronas de fenotipo catecolaminérgico (Figura 6). Este proceso de inducción de la neurogénesis comprende los siguientes procesos: 1) Activación de las CMN endógenas; 2) División de las células tipo C; 3) Generación y migración hacia el estriado de neuroblastos; 4) Diferenciación hacia el fenotipo catecolaminérgico, supervivencia y maduración de las nuevas neuronas generadas e integración funcional.

Los estudios realizados en animales revelan que los progenitores de la ZSV pueden ser movilizados hacia el estriado tras la administración de varios tipos de factores tróficos. (Fallon y cols. 2000; Benraiss y cols. 2001). La infusión intraestriatal del factor de crecimiento transformante α (TGF- α) en ratas lesionadas con 6-OHDA indujo la diferenciación de los progenitores de la ZSV hacia neuronas dopaminérgicas estriatales y mejoró la conducta rotacional inducida por apomorfina, aunque no se pudo establecer una correlación entre la generación de nuevas neuronas dopaminérgicas y la mejoría funcional observada (Fallon y cols. 2000). Sin embargo, estos resultados de inducción del fenotipo dopaminérgico por administración de TGF- α no han podido ser corroborados en otros trabajos (Cooper y Isacson. 2004; de Chevigny y cols. 2008). Por otro lado, Mohapel y colaboradores demostraron que la administración intracerebroventricular del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y BDNF era capaz de incrementar el número de neuronas de nueva generación en el estriado de ratas hemiparkinsonianas (Mohapel y cols. 2005). Hay que destacar que estas células expresaron los marcadores para neurona inmadura Doblecortina [(DCX), una proteína asociada a microtúbulos expresada por neuroblastos en migración], para neurona estriatal temprana (Factor de transcripción Pbx) y para neurona madura [(NeuN), Núcleo Neuronal] pero no fueron positivas para la fosfoproteína regulada por AMPc y dopamina [(DARPP-32), una proteína expresada por las neuronas estriatales de proyección maduras]. En este trabajo también se muestra la capacidad de estos factores a la hora de generar nuevas células en la SN pero sin adquirir ninguna de ellas un fenotipo neuronal. La utilización de GFLs como el GDNF para inducir neurogénesis en el cerebro adulto y la recuperación del tracto nigroestriatal arrojó

resultados positivos en cuanto al estímulo de la proliferación celular en la SN, medida por incorporación de BrdU, pero falló a la hora de demostrar si las células TH⁺ que se observaron eran o no de nueva generación (Chen y cols. 2005). La existencia o no de neurogénesis en la SN sigue siendo un tema controvertido, de todos modos, las únicas células de nueva generación que han sido identificadas con alta fiabilidad en la SN han sido de fenotipo glial y en ningún caso eran neuronas dopaminérgicas (Cooper y Isacson. 2004; Chen y cols. 2005; Peng y cols. 2008).

A parte de los factores tróficos, se sabe que neurotransmisores como la dopamina juegan un papel importante a la hora de regular la neurogénesis. En varios trabajos se ha descrito que la supresión del aporte de dopamina estriatal produce un descenso en la proliferación de las CMN y de los progenitores neurales en la SVZ tanto en animales como en el humano (Hoglinger y cols. 2004; Borta y Hoglinger. 2007), aunque recientemente se ha publicado un trabajo en el que se muestra que tanto el número de CMN adultas como su capacidad de proliferación no se ven afectadas en el cerebro parkinsoniano (van den Berge y cols. 2011). A pesar de los hallazgos descritos en este trabajo, la estimulación de los receptores de dopamina podría ser una estrategia a tener en cuenta a la hora de estimular a los progenitores neurales y de inducir su diferenciación a hacia neuronas dopaminérgicas. Van Kampen y colaboradores, demostraron la capacidad de un ligando del receptor de dopamina D3 denominado 7-hidroxi-N,N-di-n-propil-2-aminotetralina (7-OH-DPAT) para estimular la neurogénesis en la ZSV y en la SN (Van Kampen y cols. 2004; Van Kampen y Robertson. 2005). Tras la administración del compuesto en ratas lesionadas con 6-OHDA, observaron un incremento de la neurogénesis en la SN y un crecimiento de los terminales TH⁺ estriatales (Van Kampen y Robertson. 2005). Además, este efecto neurogénico y reparador fue acompañado de una mejoría en la función motora (Van Kampen y Eckman. 2006). Sin embargo, al igual que en otros trabajos, el análisis inmunohistoquímico de la neurogénesis acaecido en este estudio no confirma de manera indiscutible el efecto neurogénico hallado en la SN. Por otro lado, la mejoría de los déficits motores podría ser también achacada únicamente al crecimiento axonal de las neuronas dopaminérgicas dañadas. Asimismo, otro estudio pone de manifiesto que el tratamiento con 7-OH-DPAT no afectó a la proliferación, supervivencia o a la neurogénesis de precursores neurales murinos y humanos (Milosevic y cols. 2007), cuestionando los efectos neurogénicos de los agonistas dopaminérgicos. Sin embargo, en otro trabajo mas reciente, los autores corroboran la eficacia del uso de ligandos de los receptores de dopamina como estrategia

terapéutica basada en la estimulación de la neurogénesis en la ZSV en la EP (O'Keeffe y cols. 2009).

Por último, todavía es necesario investigar en profundidad, tanto en el cerebro sano como en el dañado, los mecanismos implicados en cada uno de los pasos de la inducción de la neurogénesis, para poder así desarrollar eficientemente este tipo de terapias basadas en los mecanismos intrínsecos de reparación del propio cerebro.

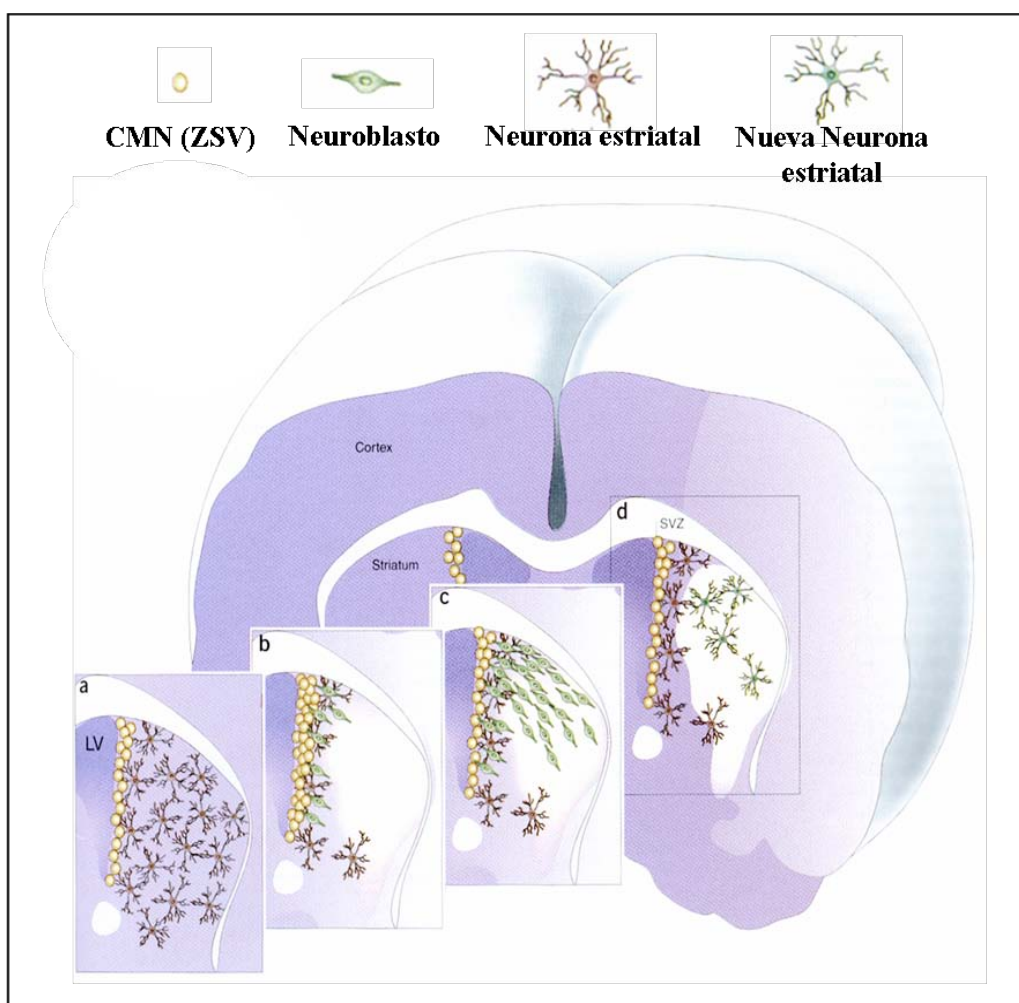


Figura 6. Estimulación de la Neurogénesis en la Zona Subventricular (ZSV) del cerebro adulto en la EP. a) Situación previa a la aparición de la EP y a la administración del agente neurogénico. b) Activación y proliferación de las células madre neurales (CMN) de la ZSV y generación de neuroblastos. c) Migración de neuroblastos hacia el estriado dañado. d) Diferenciación de los neuroblastos hacia nuevas neuronas estriatales de fenotipo catecolaminérgico. Modificado de (Kokaia y Lindvall. 2003).

4.3. Terapias basadas en el transplante de células madre en la EP.

Las células madre neurales existentes tanto en el cerebro embrionario/fetal como en el neonatal y en el adulto, tienen la capacidad de autorrenovarse y de generar una progenie que a su vez puede seguir dividiéndose o diferenciarse hacia fenotipos neurales, como son las neuronas o la glía (Kennea y Mehmet. 2002; Bazan y cols. 2004) e incluso hacia fenotipos no neurales (Vescovi y cols. 2002). Las CMN pueden ser cultivadas de manera selectiva mediante el ensayo de formación neuroesferas, desarrollado por Reynolds y Weiss (Reynolds y cols. 1992). Mediante esta técnica (Figura 7), las CMN en medio de cultivo libre de suero y suplementado con mitógenos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y/o el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) (Reynolds y cols. 1992; Vescovi y cols. 1993; Lobo y cols. 2003), proliferan en suspensión formando agregados esféricos denominados neuroesferas que a su vez pueden ser disociados, expandidos y subcultivados repetidamente.

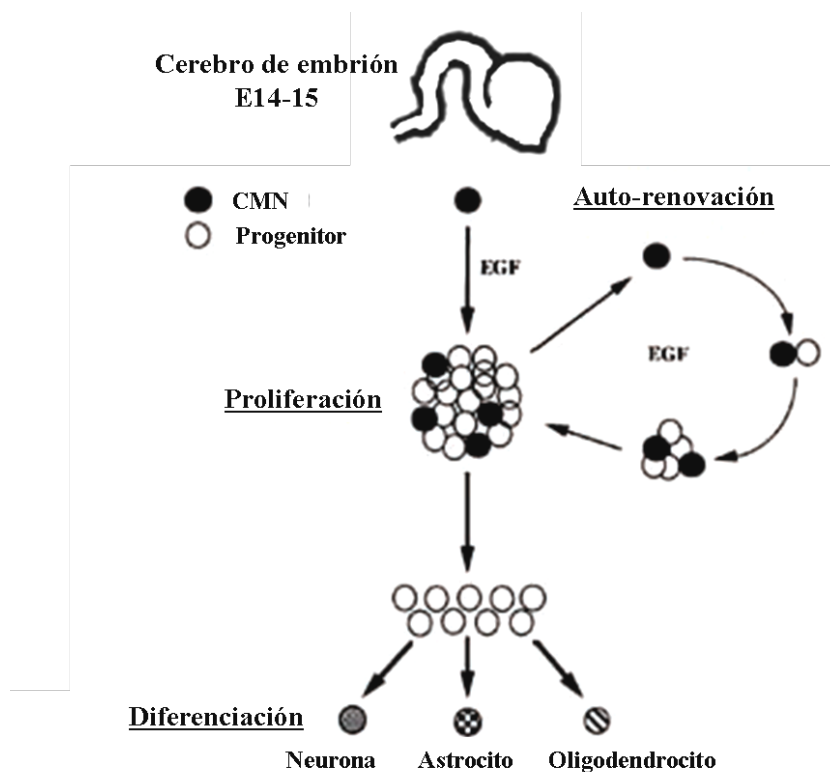


Figura 7. Esquema representativo del cultivo de células madre neurales (CMN) mediante la técnica de formación de neuroesferas. Nótese las diferentes fases del cultivo: auto-renovación; formación de neuroesferas / proliferación; y diferenciación hacia fenotipos neurales. Modificado de (Ahmed. 2009).

La capacidad de las CMN para expandirse y diferenciarse hacia neuronas, convierte a estas células en una herramienta atractiva a la hora de desarrollar estrategias basadas en el trasplante reconstructivo en varias enfermedades neurodegenerativas como la EP. Sin embargo, el potencial de las células madre y de los progenitores inmaduros que se hallan en las neuroesferas, para diferenciarse *in vivo* hacia neuronas maduras, sigue siendo un aspecto que no ha sido completamente desarrollado. Los experimentos basados en el trasplante de células derivadas de neuroesferas procedentes de roedores han revelado que la mayoría de estas células se diferencian hacia fenotipos gliales (Carpenter y cols. 1997; Winkler y cols. 1998). Además, es común que en la mayoría de los trasplantes las células permanezcan con un fenotipo inmaduro, mientras que un pequeño porcentaje suele adquirir fenotipos neurales mas diferenciados (Englund y cols. 2002a; Englund y cols. 2002b).

Para evitar la baja tasa de diferenciación de las CMN, se han desarrollado diversos protocolos con el objetivo de inducir *in vitro* el fenotipo dopaminérgico a partir de este tipo de células. Una de las aproximaciones mas habituales es la utilización de combinaciones definidas de factores solubles (GDNF, interleuquinas, AMPc, ácido ascórbico) para así promover la generación de neuronas dopaminérgicas a a partir de CMN (Carvey y cols. 2001; Sanchez-Pernaute y cols. 2001; Storch y cols. 2001; Lopez-Toledano y cols. 2004; Reimers y cols. 2008). El trasplante de estas células en el estriado lesionado de ratas hemiparkinsonianas es capaz de mejorar la conducta rotacional, indicando que las células pueden comportarse como neuronas dopaminérgicas funcionales (Carvey y cols. 2001). Además, existen estudios que sugieren que la coadministración de factores tróficos podría mejorar la eficiencia de las células implantadas en modelos de EP (Rosenblad y cols. 1996; Liu y Huang. 2007; Sharma y cols. 2007). Otra estrategia es la inserción y/o sobreexpresión de genes que codifican para factores de transcripción reguladores de la diferenciación dopaminérgica. De este modo, se han llevado a cabo trabajos en los que ha conseguido obtener neuronas dopaminérgicas mediante la expresión y la coexpresión de factores como Nurr1 (Receptor nuclear asociado 1), SHH (Erizo Sonic), Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*) y Mash1 (un factor de transcripción con motivos Hélice-Bucle-Hélice básica) en precursores neurales (Wagner y cols. 1999; Kim y cols. 2003; Liste y cols. 2004; Park y cols. 2006). Estas células modificadas genéticamente son capaces de sobrevivir en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA y de producir mejoría a nivel de conducta motora asimétrica (Park y cols. 2006). Por último, existe otra alternativa basada

en la obtención de neuronas dopaminérgicas mediante la immortalización por modificación genética de CMN o progenitores neurales. El análisis del implante de estas células en ratas hemiparkinsonianas reveló que una vez implantadas o bien no sobrevivieron o dejaron de expresar el fenotipo dopaminérgico (Paul y cols. 2007). Por razones de seguridad el uso de estas líneas celulares está restringido y solo pueden ser utilizadas para trabajar únicamente en investigación básica. Por último, aunque las CMN tienen capacidad proliferativa, no se ha observado formación de tumores tras el trasplante en modelos animales. Aún así, antes de llevar a cabo trasplantes en pacientes, se deben diseñar protocolos de cultivo celular que eliminen las CMN con capacidad proliferativa del resto de la población de células a implantar.

Por otro lado, experimentos con implantes de neuronas dopaminérgicas obtenidas a partir de células madre embrionarias (CME) murinas procedentes de la masa celular interna del blastocisto (Figura 8), han revelado la capacidad de supervivencia de estas células en el estriado de ratas con lesionadas con 6-OHDA. En algunos trabajos se muestra que este tipo de implantes son capaces de inducir mejorías en la conducta rotacional (Nishimura y cols. 2003; Baier y cols. 2004; Rodríguez-Gomez y cols. 2007) e incluso en las funciones neurológicas espontáneas (Kim y cols. 2002). Además, también se han realizado estudios para evaluar el efecto de los implantes de neuronas dopaminérgicas, obtenidas a partir de CME de primates, en monos lesionados con MPTP. Siguiendo esta línea, el trabajo realizado por Takagi y colaboradores (Takagi y cols. 2005) reveló la existencia de mejoras posturales y de motilidad e incremento en la captación estriatal de ^{18}F -Dopa debido al implante de neuronas dopaminérgicas derivadas de CME en este modelo de EP. Sin embargo, dada la alta capacidad proliferativa de las CME, existe el riesgo de formación de tumores y teratomas tras el implante de estas células en el cerebro (Brederlau y cols. 2006; Roy y cols. 2006) y por ello es necesario discernir los mecanismos que subyacen en la generación de estos eventos adversos antes de llevar a la clínica este tipo de estrategias.

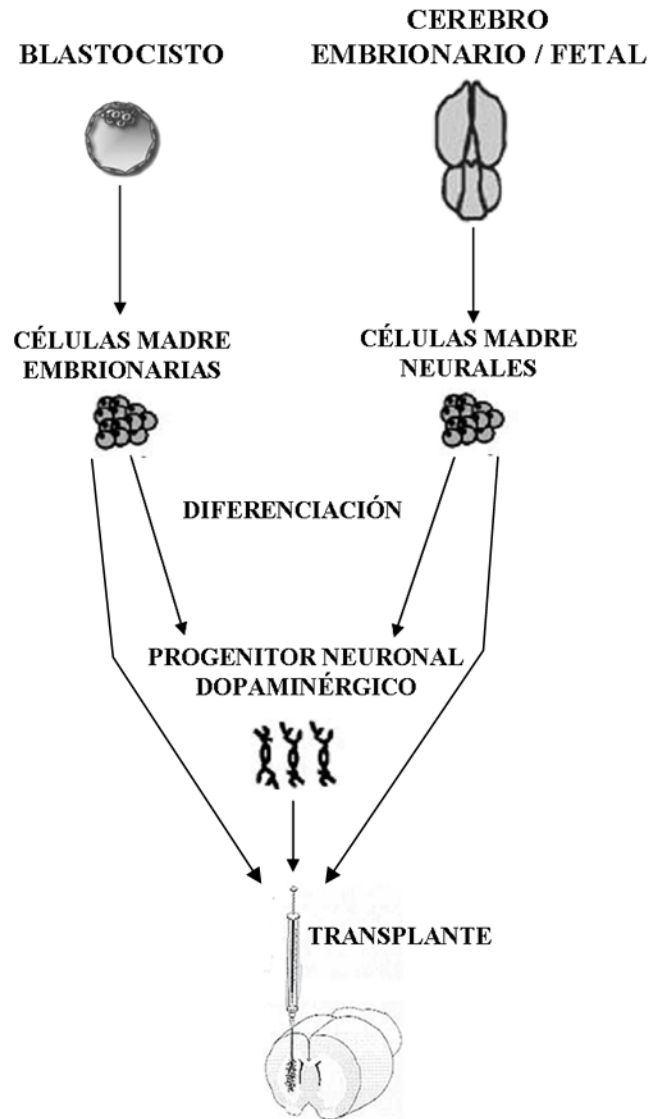


Figura 8. Esquema representativo de varias estrategias utilizadas en las terapias experimentales con células madre en la Enfermedad de Parkinson. Modificado de (Wang y cols. 2007a).

La terapia celular basada en el transplante de neuronas dopaminérgicas fetales procedentes del mesencéfalo ventral (MV) humano es uno de los tratamientos experimentales mas destacados en el contexto de los ensayos clínicos en la EP. Tras varios años de estudios en modelos animales, uno de los primeros ensayos clínicos en el que se utilizó tejido del MV, obtenido a partir de embriones procedentes de abortos, fue llevado a

cabo por Lindvall y colaboradores al final de la década de los ochenta (Lindvall y cols. 1989). Varios grupos de pacientes, que han participado en distintos ensayos clínicos abiertos de reducido tamaño, han experimentado mejorías significativas en la evaluación clínica general, aumento en la velocidad de ejecución de los movimientos y reducción de la rigidez. Además, el análisis de los resultados obtenidos mediante la tomografía de emisión de positrones (PET) reveló la capacidad de supervivencia a largo plazo y la funcionalidad de los implantes llevados a cabo en estos pacientes (Hauser y cols. 1999; Mendez y cols. 2000; Hagell y Brundin. 2001). Mas adelante, se realizaron dos ensayos doble ciego comparados con cirugía placebo financiados por los Institutos Nacionales de Salud de EEUU cuyos resultados solo arrojaron mejoras en la sintomatología a largo plazo en determinados grupos de pacientes. Además, varios pacientes desarrollaron disquinesias en fase *off* asociadas al implante (Freed y cols. 2001; Olanow y cols. 2003). El uso clínico de este tipo de terapia celular se halla temporalmente interrumpido debido a los diferentes resultados de estos ensayos controlados y a la aparición disquinesias asociadas al implante.

Para que la terapias celulares basadas en el transplante de neuronas dopaminérgicas obtenidas a partir de CMN puedan ofrecer mejores resultados clinicos que los trasplantes de tejido mesencefálico, es necesario que los implantes de este tipo de células cumplan con los siguientes requisitos: 1) Producción estable de dopamina. 2) Si tras el implante en modelos experimentales, se observan mejorías en los síntomas parkinsonianos, éstas deben de estar bien documentadas. 3) Una cantidad suficiente de neuronas dopaminérgicas transplantadas en el estriado del paciente deben de ser capaces de sobrevivir. 4) Las neuronas implantadas deben de integrarse física y funcionalmente en el cerebro, además de inducir la reconstrucción de los circuitos neurales (Hagell y Brundin. 2001; Date y Yasuhara. 2009). En resumen, es necesario continuar investigando en este tipo de estrategias para que la terapia celular basada en el implante de CMN pueda llegar a convertirse en un tratamiento aplicable a los pacientes con EP.

IV.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

El Factor de Crecimiento de Hígado está caracterizado químicamente como un complejo albúmina-bilirrubina y se ha demostrado su capacidad para estimular la proliferación celular y la regeneración tisular en diferentes patologías tanto hepáticas como extrahepáticas. Debido a los efectos pleiotrópicos ejercidos por este factor, planteamos como hipótesis de trabajo que la administración de LGF podría ejercer efectos beneficiosos en un modelo experimental en rata de Enfermedad de Parkinson y que el potencial terapéutico del LGF podría estar mediado por la generación de nuevas neuronas dopaminérgicas (neurogénesis), o deberse a un efecto neuroprotector y/o neuroregenerador sobre el sistema dopaminérgico dañado.

2. OBJETIVOS

- 1.- Valorar si la infusión intracerebral de LGF es capaz de promover la neurogénesis mediante la estimulación de las células madre neurales de la zona subventricular en el modelo experimental de EP por lesión con 6-OHDA. Se analizará la capacidad del factor para generar nuevas neuronas dopaminérgicas.
- 2.- Determinar si la infusión intracerebral de LGF puede ejercer efectos neuroregenerativos y/o neuroprotectores en el estriado carente de dopamina y sobre las neuronas dopaminérgicas dañadas de la SN.
- 3.- Una vez verificados los objetivos 1 y 2, se estudiará otra posible vía de administración del factor menos invasiva, la inyección intraperitoneal. Se valorarán los parámetros mencionados en los apartados anteriores, además de los posibles mediadores celulares y mecanismos moleculares que intervienen en las acciones del factor.
- 4.- Determinar si en el Parkinson experimental la administración de LGF promueve una mejoría funcional evaluando: 1) la conducta rotacional inducida por apomorfina; y 2) la coordinación motora mediante el test de rota rod.

Hipótesis y Objetivos

5.- Estudiar el potencial terapéutico de los implantes de células madre neurales (CMN) y la co-administración intracerebral de LGF evaluando: 1) los efectos del LGF sobre la supervivencia y la diferenciación de las células implantadas; 2) la capacidad neuroregeneradora y/o neuroprotectora sobre el sistema dopaminérgico dañado; y 3) la funcionalidad de los implantes de CMN en combinación con el factor mediante el test de conducta rotacional inducida por apomorfina.

V.-MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

1.1 Reactivos de uso general

Reactivo	Casa Comercial
Ácido clorhídrico	Panreac
Cloruro potásico	Merck
Cloruro sódico	Sigma
Hidróxido de sodio	Merck
PBS (pastillas)	Gibco
Trizma base	Sigma

1.2 Reactivos para histología

Reactivo	Casa Comercial
3,3-Diaminobencidina	Dako
Bisbencimida	Sigma
Citrato sódico	Merck
Complejo streptavidina–biotina–peroxidasa	Dako
p-fenilenodiamina	Sigma
Paraformaldehído	Merck
Sacarosa	Panreac
Suero normal de cabra	PAA
Tissue-Tek®	O.C.T™
Triton X-100	Sigma

1.3 Reactivos para bioquímica

Reactivo	Casa Comercial
5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP)	BIO-RAD
Acetato magnésico	Merck
Acrilamida / Bisacrilamida	BIO-RAD
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma
Antipaina	Sigma
Azul de bromofenol	Merck
Azul de nitrotetrazolio / x-fosfato (NBT)	BIO-RAD
β -mercaptoetanol	Panreac
β -glicerofosfato	Sigma
Benzamidina	Sigma
Blotto	GE Healthcare
Cloruro de Magnesio	Merck
DL-Ditiotreitol (DTT)	Sigma
Dodecil-sulfato-sódico (SDS)	Serva
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Glicerol	Sigma
Glicina	Sigma
Leupeptina	Sigma
Metanol	Merck
Molibdato sódico	Sigma
N-N-N'-N'-tetrametilen-diamina (TEMED)	BIO-RAD
Ortovanadato sódico	Sigma
Pepstatina A	Sigma
Persulfato amónico	Sigma
Tween-20	Sigma

1.4 Reactivos para cultivos celulares.

Reactivo	Casa Comercial
DMEM (Eagle modificado por Dulbecco)	GIBCO
F12 de Ham con L-glutamina.	GIBCO
L-Glutamina	GIBCO
Piruvato sódico	GIBCO
D-Glucosa (45%)	Sigma
Putrescina	Sigma
Progesterona	Sigma
Selenito sódico	Sigma
Insulina	Sigma
Transferrina Humana	Boehringer Mannheim
EGF recombinante humano	Boehringer Mannheim

2. PURIFICACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HÍGADO (LGF)

En suero de ratas Wistar, después de cinco semanas de ligadura del conducto biliar, se midió la concentración del LGF por HPLC (Singh y Bowers. 1986), escogiéndose el suero de concentración más elevada para la purificación del LGF mediante tres pasos de cromatografía. Además se determinó la actividad *in vivo* del factor llevando a cabo la valoración de la estimulación de la síntesis de ADN en hígado de rata mediante incorporación de ^3H -timidina (New England Nuclear). El procedimiento detallado ya fue publicado anteriormente (Díaz-Gil y cols. 1994). La pureza de la preparación del LGF se comprobó por electroforesis en geles de poliacrilamida (Laemmli. 1970). Las muestras del LGF se guardaron liofilizadas, conservándose cerradas al vacío a 4° C. En el momento de su utilización se disolvieron en salino estéril y se infundieron en el cerebro de las ratas hemiparkinsonianas por medio de minibombas osmóticas (ALZET[®]) a una dosis de 160 ng / rata / día ó se administraron por vía intraperitoneal en los animales hemiparkinsonianos a una dosis de 5µg / rata.

3. ANIMALES Y MODELO EXPERIMENTAL DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

Todos los procedimientos descritos en esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo de acuerdo con la legislación española y europea para el uso de animales de experimentación [(RD 53/2013) y (Directiva 2010/63/UE)] y han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Se utilizaron ratas albinas hembra Sprague Dawley que pesaban entre 220 y 250 g al inicio de los experimentos. Los animales fueron estabulados en un ambiente con la temperatura controlada, bajo ciclos de luz / oscuridad de 12 horas y con acceso a comida y bebida “ad libitum”.

La anestesia de los animales fue inducida con una mezcla de isoflurano (Baxter) al 4% y oxígeno a un flujo de 1 l/min durante 4 minutos y se mantuvo con una mezcla de isoflurano al 2% y oxígeno a un flujo de 1 l/min durante el resto de la cirugía. Una vez comprobada la falta de reflejo corneal se procedió a fijar la cabeza del animal en un aparato estereotáxico (David Kopf, mod. 1204, California, EEUU). Se practicó una incisión antero-posterior en la piel de la cabeza, dejando al descubierto la zona comprendida entre bregma y lambda. Se liberó el hueso craneal del periostio y para mantener descubierta la calota se utilizó un separador de piel que se introdujo entre los huesos temporales y los músculos temporales. La temperatura corporal fue monitorizada regularmente con ayuda de una sonda rectal y se mantuvo constante a 36,5 °C mediante el uso de una manta eléctrica.

La cabeza del animal fue dispuesta de forma que la superficie de la calota quedara en un plano horizontal. El bregma se escogió como origen de las coordenadas antero-posteriores (AP) y medial-laterales (ML). Como origen de las coordenadas dorso-ventrales (DV) se utilizó la superficie de la corteza cerebral.

Una serie de animales fueron lesionados en la vía nigroestriatal del hemisferio izquierdo (Ungerstedt. 1971) mediante la administración de dos inyecciones estereotáxicas de 4 µl de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma) (3,5 mg/ml en L-ascorbato-salino 0,2 mg/ml). La primera inyección fue realizada en la sustancia negra pars compacta y la segunda en el fascículo prosencefálico medial.

En la otra serie de animales se llevó a cabo la lesión parcial del sistema nigroestriatal (Kirik y cols. 1998) mediante la administración de cuatro inyecciones estereotáxicas en el estriado de 2 µl de 6-OHDA (3,5 mg/ml en L-ascorbato-salino 0,2 mg/ml).

En ambos modelos de lesión, el flujo de inyección fue de 1 µl/min y la aguja Hamilton de 10 µl permaneció durante cinco minutos en el lugar de la inyección antes de ser retirada lentamente. La solución de 6-OHDA recién preparada se mantuvo, antes de su uso, en hielo y protegida de la exposición a la luz para así evitar la variabilidad debida a la degradación de la neurotoxina.

Las coordenadas escogidas para las lesiones, siguiendo el atlas estereotáxico de Paxinos (Paxinos y Watson. 1997), fueron (en mm) las siguientes:

- Lesión de la vía nigroestriatal: (barra dental -3,0)
 - Sustancia Negra pars compacta: AP: -5,3; ML: +2,1 y V: -7,8.
 - Fascículo prosencefálico medial: AP: -4,3; ML: +1,4 y V: -8,7.

- Lesiones estriatales parciales: (barra dental 0,0).
 - Zona 1: AP: +1,3; ML: -2,6 y DV: -5,0.
 - Zona 2: AP: +0,4; ML: -3,0 y DV: -5,0.
 - Zona 3: AP: -0,4; ML: -4,2 y DV: -5,0.
 - Zona 4: AP: -1,3; ML: -4,5 y DV: -5,0.

4. CULTIVOS CELULARES

4.1 Obtención de células madre neurales a partir del estriado embrionario de rata

Los primordios estriatales de embriones E-15 de rata Sprague-Dawley fueron diseccionados y a continuación disociados mecánicamente. Las células madre neurales (CMN) fueron cultivadas en suspensión en medio definido (DF12) que estaba compuesto por DMEM y F-12 (1:1), L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, glucosa al 0,6%, insulina 25 µg/ml, progesterona 20 nM, putrescina 60 µM, ~~selección~~ ^{selección} 30 nM, transferrina humana 100 µg/ml y EGF recombinante humano 20 ng/ml. Después de 48 -72 horas en cultivo, las células empezaron a crecer como neuroesferas libres en flotación. Los pases se realizaron cada 2 ó 3 días mediante disgregación mecánica. Las neuroesferas fueron disociadas después de un mínimo de 4 y un máximo de 5 pases. Veinticuatro horas después, se añadió a los cultivos 5-Bromodeoxiuridina 50 µM (BrdU, marcador de síntesis de ADN) y se mantuvieron durante 48 horas adicionales. Este marcador se usó para valorar la proliferación celular e identificar a las células y a su progenie una vez implantadas en el estriado de las ratas seleccionadas para el estudio. Antes de llevar a cabo los implantes, las células vivas fueron cuantificadas mediante el método de exclusión con azul tripán (salino/EDTA 2mM, 1:8).

5 ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO

5.1 Test de Conducta Rotacional

Para determinar si la lesión con 6-OHDA había tenido éxito, quince días después de la cirugía, se inició el estudio de la conducta rotacional inducida por apomorfina (la inyección subcutánea de este agonista dopaminérgico induce un comportamiento rotacional contralateral a la lesión). Los animales fueron colocados en un rotómetro de plástico y se conectaron a un contador mecánico. El inicio del recuento de las rotaciones tuvo lugar 5 minutos después de la inyección subcutánea de apomorfina (Sigma) (0,5 mg/Kg diluida en salino). Acto seguido, la asimetría rotacional fue monitorizada durante 15 minutos. Los animales que dieron al menos 100 giros durante 15 minutos (6,66 giros/min) fueron seleccionados para los experimentos posteriores de administración de factores. El éxito de la lesión fue entorno a un 60% en el modelo de lesión completa de la

vía nigroestriatal y entorno a un 80% en el modelo de lesión estriatal parcial. La conducta rotacional de los animales fue evaluada una vez a la semana hasta el final del período de estudio.

5.2 Evaluación de la coordinación motora (test Rota Rod)

La coordinación motora se evaluó utilizando un Rota Rod (PanLab S.L., Mod. LE 8500, Cornellá, España), el cual consiste en una barra con rotación motorizada sobre la que se sitúa al animal perpendicularmente al eje mayor con la cabeza orientada en sentido contrario al de rotación. Antes de iniciar la lesión parcial del estriado con 6-OHDA los animales recibieron 3 sesiones de entrenamiento para familiarizarse con el “test” de coordinación motora. En cada sesión, se realizaron 4 valoraciones del tiempo de permanencia de cada animal en la barra a velocidad constante (28 r.p.m. en 1 minuto), y otras cuatro con aceleración progresiva (incremento de 4 a 40 r.p.m. en 1 minuto) durante un tiempo máximo de un minuto. Para reducir el stress y la fatiga, los animales descansaron durante un tiempo de 10 minutos entre cada valoración. Los animales que durante el período de entrenamiento permanecieron en el rota rod más de 1 minuto tanto en velocidad constante como en aceleración fueron seleccionados para ser lesionados parcialmente con 6-OHDA intraestriatal y formar parte de los posteriores experimentos de administración intraperitoneal de LGF. Durante dichos experimentos, se llevó a cabo un “test” semanal hasta el sacrificio de los animales, siguiendo los mismos parámetros tanto de aceleración como de velocidad constante usados durante el período de entrenamiento.

6. ADMINISTRACIÓN DE LGF E IMPLANTES CELULARES

6.1 Preparación de minibombas osmóticas para infusión intracerebral

Los animales que recibieron tanto la infusión intraestriatal como la infusión intraventricular de LGF o vehículo, fueron estereotáxicamente implantados con una cánula de infusión de calibre 28 (Kit de infusión cerebral, ALZET[®], California, EEUU) conectada a una minibomba osmótica (ALZET[®], mod. 2002, California, EEUU) mediante un catéter de 5 cm de longitud. El montaje y manipulación de las minibombas osmóticas se realizó en condiciones de esterilidad.

Las minibombas osmóticas fueron colocadas subcutáneamente en una región posterior a la escápula y estaban diseñadas para infundir a un flujo de 0,5 $\mu\text{l/h}$. La solución infundida al grupo vehículo estaba constituida por albúmina de rata (Sigma) 100g/ μl en salino estéril. Los grupos experimentales con LGF fueron infundidos con una dosis de 160 ng/día/rata de LGF añadida a la solución vehículo. Las minibombas fueron rellenas con 200 μl de la solución que correspondiese y se dejaron incubando en salino estéril a 37° C durante la noche anterior al inicio de la infusión.

6.2 Infusión intraestriatal de LGF

La cánula unida a la minibomba fue estereotáxicamente implantada en el estriado del hemisferio izquierdo (AP: +0,5; ML: +3,5; DV: -4,5) usando bregma como referencia. Las coordenadas DV fueron calculadas tomando como referencia la superficie de la corteza cerebral. La barra de los dientes fue ajustada a -3,0 mm. La preparación de las minibombas osmóticas y de los factores infundidos fue igual a lo descrito en el apartado 6.1.

Seis semanas después de la lesión unilateral de la vía nigroestriatal con 6-OHDA, los animales fueron divididos en grupos según la solución infundida y el tiempo de infusión (Figura 9), como sigue a continuación: Infusión intraestriatal de LGF durante 15 días (IS-LGF 15d), infusión intraestriatal de vehículo durante 15 días (IS-vehículo 15d), infusión intraestriatal de LGF durante 48 horas (IS-LGF 48H) e infusión intraestriatal de vehículo durante 48 horas (IS-vehículo 48H). Los animales del grupo control de la lesión no fueron sometidos al implante de la minibomba osmótica y fueron sacrificados 6 semanas después de la lesión con 6-OHDA.

Los animales pertenecientes a los grupos IS-LGF 15d e IS-vehículo 15d fueron sacrificados 2 semanas después del fin del período de infusión. Los animales con infusión intraestriatal durante 48 horas (IS-LGF 48H) e (IS-vehículo 48H) fueron sacrificados al finalizar el período de infusión.

Además, hubo un grupo de animales que también cursaban seis semanas de lesión cuando recibieron una inyección intraestriatal de 160 ng de LGF ó de vehículo (salino) con ayuda de una aguja Hamilton de 10 μl . El volumen inyectado fue de 2 μl a un flujo de 1 $\mu\text{l/min}$ y la aguja permaneció durante cinco minutos en el lugar de la inyección antes de ser retirada lentamente. Estos animales fueron sacrificados transcurridas 24 horas y los

grupos fueron denominados de este modo: IS-LGF 24H (Inyección IS de 160 ng de LGF y sacrificio a las 24 horas) e IS-Vehículo 24H (Inyección IS de vehículo y sacrificio a las 24 horas). Las coordenadas estereotáxicas elegidas fueron las mismas que en el resto de grupos de infusión intraestriatal.

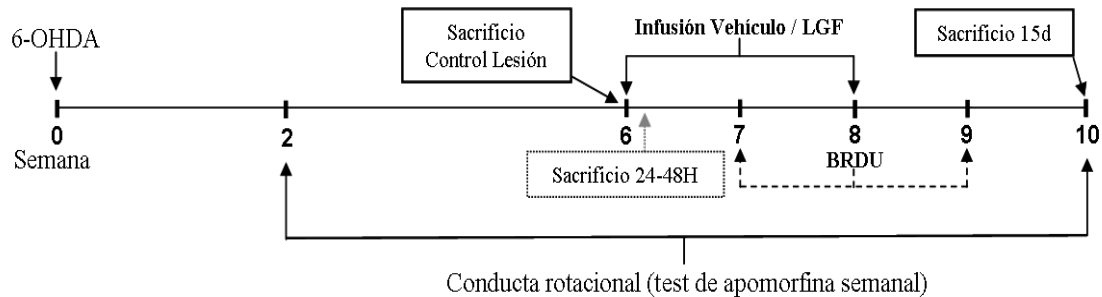


Figura 9. Esquema representativo de la infusión intraestriatal de LGF.

6.3 Infusión intraventricular de LGF

Los animales, con lesión unilateral de seis semanas por inyección de 6-OHDA en la vía nigroestriatal, fueron sometidos a la colocación en el ventrículo lateral de la cánula conectada a la minibomba osmótica. La preparación de dichas minibombas osmóticas y de los factores infundidos fue igual a lo descrito en el apartado 6.1. Las cánulas fueron estereotáxicamente implantadas en el ventrículo lateral izquierdo (AP: -0,8; ML: +1,4; DV: -4,5) usando bregma como referencia. Las coordenadas DV fueron calculadas tomando como referencia la superficie de la corteza cerebral. La barra de los dientes fue ajustada a -3,0 mm. La minibomba fue colocada subcutáneamente en una región posterior a la escápula.

Los animales fueron divididos en grupos, según la solución infundida y el tiempo de infusión (Figura 10), como sigue a continuación: Infusión intracerebroventricular durante 15 días de LGF (ICV-LGF 15d), infusión intracerebroventricular de vehículo durante 15 días (ICV-Vehículo 15d), infusión intracerebroventricular de LGF durante 7 días (ICV-LGF 7d), infusión intracerebroventricular de vehículo durante 7 días (ICV-Vehículo 7d), infusión intracerebroventricular durante 15 días de LGF y sacrificio a los 30 días del inicio de la infusión (ICV-LGF 30d) e infusión intracerebroventricular durante 15 días de vehículo y sacrificio a los 30 días del inicio de la infusión (ICV-Vehículo 30d). Las ratas

pertenecientes al grupo control de la lesión no fueron sometidos al implante de la minibomba osmótica y fueron sacrificados 6 semanas después de la lesión con 6-OHDA. Un grupo de ratas sin lesión recibieron una infusión intracerebroventricular durante 7 días de vehículo (Sanas-ICV-Vehículo 7d) ó de LGF (Sanas-ICV-LGF 7d). Los animales pertenecientes a los grupos cuya duración de la infusión intracerebroventricular fue de 7 ó 15 días fueron sacrificados al finalizar el período de infusión respectivo, excepto los grupos ICV-LGF 30d e ICV-Vehículo 30d, cuyo período de infusión fue de 15 días pero fueron sacrificados 30 días después del inicio de la infusión.

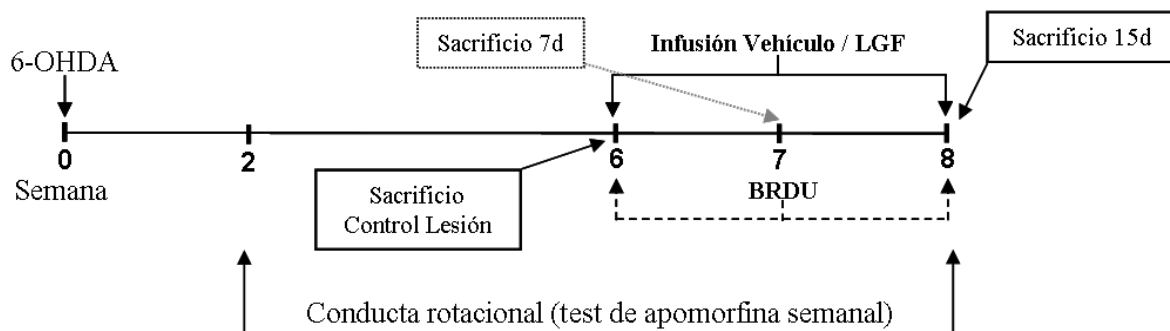


Figura 10. Esquema representativo de la infusión intraventricular de LGF.

6.4 Implantes de células madre neurales e infusión de LGF en el estriado de ratas sanas y lesionadas con 6-OHDA.

Ratas sanas y lesionadas con 6-OHDA en la vía nigroestriatal fueron implantadas con células derivadas de neuroesferas marcadas con BrdU. El implante se realizó ocho semanas después de la lesión y tuvo lugar en el estriado del hemisferio izquierdo (Figura 11). Cada animal recibió una inyección estereotáxica de 5 μ l de una suspensión celular que contenía 10^5 células/ μ l. Las coordenadas usadas para el implante fueron (en mm) respecto a bregma y la corteza cerebral: AP +0,5; ML +2,6; DV -5,5; barra de los dientes: -3,0. El flujo de inyección de las células derivadas de neuroesferas fue de μ l/min. La aguja Hamilton permaneció durante cinco minutos en el lugar de la inyección antes de ser retirada lentamente. A continuación, la cánula unida a la minibomba fue estereotáxicamente implantada en el estriado del hemisferio izquierdo (AP: +0,5; ML: +2,6; DV: -4,5; barra de los dientes: -3,0) usando bregma y la superficie de la corteza

cerebral como referencia. La preparación de las minibombas osmóticas y de los factores infundidos fue igual a lo descrito en el apartado 6.1. El tiempo de infusión fue de 15 días.

Los animales con implantes fueron divididos en diferentes grupos, de acuerdo con la solución infundida y la presencia o no de lesión con 6-OHDA (Figura 11), como sigue a continuación: Infusión intraestriatal de LGF en ratas lesionadas con 6-OHDA (IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS), infusión intraestriatal de vehículo en ratas lesionadas con 6-OHDA (IS-Vehículo-6-OHDA-CÉLULAS), infusión intraestriatal de LGF en ratas sanas (IS-LGF-SANAS-CÉLULAS) e infusión intraestriatal de vehículo en ratas sanas (IS-Vehículo-SANAS-CÉLULAS). El sacrificio de todos los grupos de animales tuvo lugar 6 semanas después del implante de las CMN.

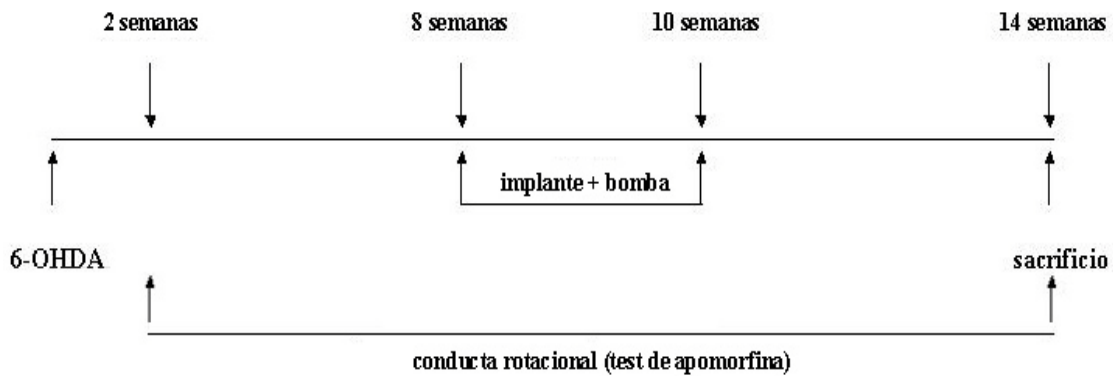


Figura 11. Esquema representativo del proceso de implante de células madre neurales y de la aplicación de bombas de infusión intraestriatal.

6.5 Administración intraperitoneal de LGF

Los animales utilizados en los experimentos de administración intraperitoneal tenían parcialmente lesionado el sistema nigroestriatal con 6-OHDA intraestriatal y cursaban una lesión de 6 ó 13 semanas de evolución al inicio del tratamiento (Figura 12).

Un grupo de animales, que cursaban una lesión de 6 semanas, recibió dos inyecciones intraperitoneales semanales de salino (IP-Vehículo) ó de LGF (5 µg/rata) (IP-LGF) durante 3 semanas. Este grupo de animales fue sacrificado 4 semanas después del fin del período de administración intraperitoneal de salino o de LGF.

Un segundo grupo de animales, que cursaban una lesión de 13 semanas, recibió una única inyección intraperitoneal de salino (IP-Vehículo 24, 48 ó 72H) o de LGF (5 µg/rata) (IP-LGF 24, 48 ó 72H) y fue sacrificado a las 24, 48 ó 72 horas del inicio del tratamiento.

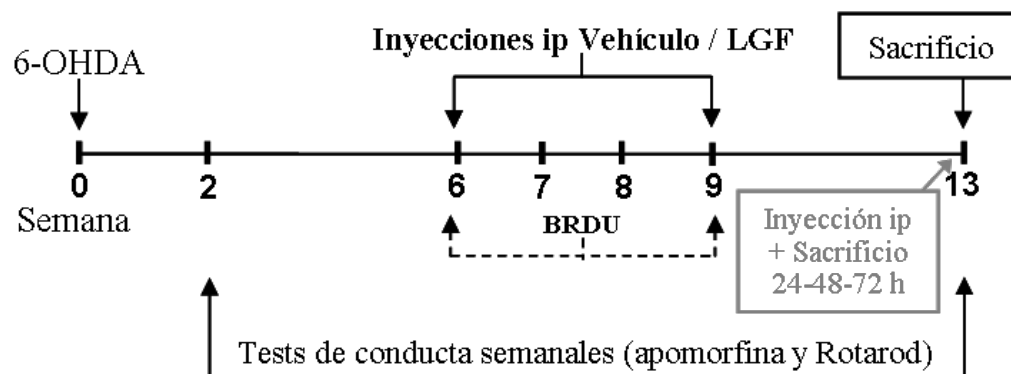


Figura 12. Esquema representativo de la administración intraperitoneal de LGF.

Los datos obtenidos mediante *Western blot* e inmunohistoquímica, de los animales pertenecientes a los grupos IP-Vehículo 24, 48 ó 72H y de los pertenecientes al grupo que recibió 3 inyecciones de vehículo durante tres semanas (IP-Vehículo) fueron agrupados a la hora de ser analizados, debido a que no se observó ninguna diferencia significativa entre los cuatro grupos, en ninguno de los parámetros analizados, que dependiese de la tasa y el momento de la administración de la solución vehículo. Además, todos los animales de estos grupos cursaban el mismo tiempo de lesión cuando fueron sacrificados (13 semanas).

7. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Para determinar si la administración de LGF era capaz de incrementar la proliferación celular y/o la neurogénesis tanto en el estriado como en la SN, los animales de los diferentes grupos experimentales recibieron inyecciones intraperitoneales de Bromodeoxiuridina (BrdU) (Sigma) (50 mg/Kg) durante el período de tratamiento con vehículo o LGF. La BrdU es un análogo de timidina que se intercala en el ADN en síntesis, por lo que es un marcador de proliferación que suele utilizarse en dobles inmunofluorescencias.

Siete días después del inicio de la infusión, los animales pertenecientes a los grupos IS-Vehículo 15d e IS-LGF 15d, fueron inyectados diariamente con BrdU durante dos semanas.

Veinticuatro horas después del inicio de la infusión, los animales de los grupos ICV-Vehículo 15d, ICV-LGF 15d, ICV-Vehículo 30d e ICV-LGF 30d fueron inyectados diariamente con BrdU durante las dos semanas que duró la infusión.

Los animales pertenecientes a los grupos IP-Vehículo e IP-LGF fueron inyectados diariamente con BrdU durante las 3 semanas que duró el tratamiento con vehículo ó LGF.

No hubo administración de BrdU intraperitoneal en los animales de los grupos con implante celular ni en los pertenecientes a los grupos IP-Vehículo 24, 48 ó 72H e IP-LGF 24, 48 ó 72H.

8. HISTOLOGÍA

8.1 Procesado del tejido

Los animales, bajo anestesia consistente en Ketamina (Pfizer) (62,5 mg/Kg), atropina (Braun) (0,25 mg/Kg) y diazepam (Roche) (5 mg/Kg), fueron perfundidos vía aorta ascendente con 50 ml de salino isotónico heparinizado seguidos por 250 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino 0,1 M (PBS) pH 7,4. A continuación los cerebros fueron extraídos y se postfijaron a 4°C en la misma solución. Después de 24 horas de post-fijación, los cerebros se lavaron secuencialmente con sacarosa al 10%, 20% y 30% en PBS 0,1 M (pH 7,4) para posteriormente ser embebidos en Tissue-Tek® y rápidamente congelados con hielo seco y proceder así a realizar secciones coronales de 20 µm de grosor en un criostato (Microm, Mod. HM 550, Walldorf, Alemania).

8.2 Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica

Las secciones fueron montadas en portaobjetos recubiertos de silano (Thermo Scientific), tratadas con citrato sódico 10 mM (pH 6,0) a 95° C durante 5 minutos y preincubadas con solución de bloqueo compuesta por suero normal de cabra al 5% en

tampón Tris-salino 0,15 M NaCl y 0,1 M Tris HCl, pH 7.4 / Triton-X 100 al 0.1% durante 30 minutos. Los anticuerpos primarios fueron aplicados durante 24 horas a temperatura ambiente y la mayoría de ellos fueron visualizados por inmunofluorescencia, usando los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con fluorocromos dirigidos contra las especies en las cuales el anticuerpo primario fue obtenido.

Anticuerpo	Tipo	Título	Casa comercial
Bax	policlonal de conejo	1/250	Santa Cruz Biotech.
β-Tubulina III	monoclonal de ratón	1/500	BabCO
Bcl-2	monoclonal de ratón	1/25	Santa Cruz Biotech
Brdu	monoclonal de ratón	1/20	Dako Cytomation
Brdu	monoclonal de rata	1/25	AbD Serotec
DAT	policlonal de conejo	1/50	Chemicon
Doblecortina (DCX)	policlonal de cobaya	1/3000	Chemicon
ERK1/2 di(Thr183yTyr185P)	monoclonal de ratón	1/500	Sigma
GFAP	policlonal de conejo	1/200	Dako Cytomation
Laminina	policlonal de conejo	1/25	Sigma
Nestina	monoclonal de ratón	1/20	D. S. Hybridoma Bank
NeuN	monoclonal de ratón	1/1000	Chemicon
OX6	monoclonal de ratón	1/250	AbD Serotec
fosfo-CREB (Ser133)	policlonal de conejo	1/500	Upstate
PCNA	policlonal de conejo	1/75	Santa Cruz Biotech.
RECA	monoclonal de ratón	1/20	AbD Serotec
RIP (anti-oligodendrocitos)	monoclonal de ratón	1/1000	Chemicon
S-100	policlonal de conejo	1/10	Dako Cytomation
TH	monoclonal de ratón	1/500	Chemicon
TNF-α	policlonal de cabra	1/250	Santa Cruz Biotech

Tabla 3. Anticuerpos primarios empleados en Histología.

Los anticuerpos secundarios empleados fueron los siguientes: anti-IgG de ratón biotinilado (Zymed) (sin diluir), anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor-568 (Molecular Probes) (1/500), anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor-488 (Molecular Probes) (1/500), anti-IgG de rata conjugado con Alexa Fluor-488 (Molecular Probes) (1/500), anti-IgG de ratón conjugado con Fluoresceína (Jackson ImmunoResearch)

(1/20) y anti-IgG de cobaya conjugado con Cy2 ó Cy3 (Jackson ImmunoResearch) (1/500).

En algunos casos, los anticuerpos anti-nestina y anti-P-ERK1/2, fueron visualizados mediante un procedimiento con inmunoperoxidasa, usando un anticuerpo secundario biotinilado (Zymed) y seguido por una incubación con el complejo streptavidina–biotina–peroxidasa. La reacción fue detectada con 3,3-Diaminobencidina. Durante la visualización de dobles inmunomarcajes para BrdU, los marcadores celulares fueron detectados antes de la inmunotinción para BrdU. Para llevar a cabo la inmunodetección de BrdU, las secciones fueron incubadas con HCl 2N a 37° C durante 30 minutos y lavadas en tampón Tris-salino antes de añadir la solución de bloqueo previa al anticuerpo anti-BrdU.

Una serie de secciones fue procesada secuencialmente para la detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) ó de BrdU, seguida de la detección de microglía / macrófagos mediante isoelectina B4 (IB4). Después de la visualización de PCNA, las secciones fueron bloqueadas de nuevo con solución de bloqueo e incubadas con isoelectina IB4 conjugada con peroxidasa (Sigma) (1/20) durante 2 horas. Finalmente, el producto de la reacción fue detectado con 3,3-Diaminobencidina.

El anticuerpo Bcl-2 fue visualizado usando un anticuerpo anti-ratón biotinilado. A continuación, las secciones fueron incubadas con un complejo estreptoavidina-biotina-peroxidasa (DakoCytomation, Dinamarca) y finalmente fueron reveladas con un sistema cromógeno-substrato y diaminobencidina (ambos de DakoCytomation).

Todas las secciones fueron montadas con *non-fade* Hoeschst que contenía p-fenilenodiamina y bisbencimida para la detección de los núcleos celulares.

8.3 Análisis Morfométrico

8.3.1 Análisis morfométrico en la infusión IS.

Para la estimación cuantitativa de las fibras inmunorreactivas para TH y de las células positivas para PCNA o IB4 en el estriado, se utilizó un microscopio Olympus Bx51 (Olympus, Ballerup, Dinamarca) junto con el sistema de análisis estereológico asistido por

ordenador (CASTGRID; Olympus, Ballerup, Dinamarca). Las medidas, en cada animal, fueron realizadas en varias secciones coronales procedentes de los niveles rostrocaudales del estriado: AP +1,2 y AP +0,5 con respecto a bregma (el segundo nivel fue centrado en el sitio de infusión). Para la estimación cuantitativa de las fibras inmunorreactivas para tirosina hidroxilasa (TH), el área del estriado fue perfilada y medida en cada sección coronal usando el objetivo 10X. El área ocupada por las fibras TH+ fue expresada como un porcentaje del área total del estriado de la sección coronal. Las células PCNA+ e Isolectina IB4+ fueron expresadas como células positivas / mm². El número de células TH+ en la SNpc fue valorado usando el objetivo 20X en dos secciones coronales de cada animal cuyas coordenadas estereotáficas con respecto a bregma fueron: AP: -5,3 y AP: -5,4.

8.3.2 Análisis morfométrico en la infusión ICV.

El análisis morfométrico de los efectos de la infusión ICV fue realizado usando el mismo sistema descrito en el apartado 8.3.1. La estimación cuantitativa de las células inmunorreactivas para BrdU, antígenos neurales e isolectina IB4 se llevó a cabo mediante un muestreo aleatorio sistemático de 25 campos con los objetivos 20X y 40X. Las medidas, en cada animal, fueron realizadas (a) en la zona subventricular y en el estriado de dos o tres secciones representativas, separadas 1 mm entre si, en la zona de infusión y (b) alrededor del tercer ventrículo en dos secciones, separadas 1 mm entre si, en la región preóptica hipotalámica.

La estimación cuantitativa de las fibras inmunorreactivas para (TH) en el estriado y de las neuronas positivas para TH en la SNpc fue llevada a cabo según la metodología descrita en el apartado 8.3.1.

8.3.4 Análisis morfométrico en la administración IP.

Se utilizó el mismo sistema de análisis definido en el apartado 8.3.1. La estimación cuantitativa de las células inmunorreactivas para BrdU en el estriado fue realizada siguiendo la misma metodología especificada en el apartado 8.3.2.

Las valoraciones en cada animal, de las fibras inmunorreactivas para TH, fueron realizadas en siete secciones coronales procedentes de los siguientes niveles anteroposteriores del estriado: AP: +1,6; AP: +1,0; AP: +0,2; AP: -0,3; AP: -0,9; AP: -1,4; y AP: -1,8 con respecto a bregma. El área del estriado fue perfilada y medida en cada sección coronal usando el objetivo 10X. El área ocupada por las fibras TH+ fue expresada como el porcentaje del área total del estriado de la sección coronal. La estimación cuantitativa de las neuronas TH+ en la SNpc fue también realizada según lo descrito en el apartado 8.3.1.

La cuantificación del número de células Bcl-2+ en la SNpc se realizó con el objetivo 10X en cortes coronales previamente teñidos frente a TH. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse Ti usando la función de escaneo de imágenes de gran tamaño proporcionada por el programa NIS elements. De este modo, se obtuvieron imágenes compuestas por varios campos unidos entre sí que comprendieron toda la SN. El área ocupada por la SNpc fue delimitada utilizando como referencia la inmunotinción frente a TH. Los contejes de células Bcl-2+ en la SNpc fue expresado como células Bcl-2 positivas/ mm². Las imágenes de doble marcaje TH / DAT y TNF- α / OX6 fueron obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse Ti acoplado a un módulo confocal Nikon C1.

8.3.5 Análisis morfométrico de los implantes de células madre neurales e infusión intraestriatal de LGF.

El análisis morfométrico de las muestras se llevó a cabo utilizando el mismo sistema descrito en el apartado 8.3.1. Para la estimación cuantitativa de las células positivas para BrdU, antígenos neurales e isolectina IB4, se realizó un muestreo aleatorio sistemático de 50 campos. Las medidas en cada animal se llevaron a cabo en las secciones coronales que contenían células implantadas BrdU+ en dos niveles diferentes del estriado, en la zona de implante (niveles 2 y 3) y en zonas posteriores del estriado (niveles 6 y 7). Para la estimación cuantitativa de la innervación catecolaminérgica o TH⁺ a lo largo del estriado, se analizaron cortes coronales obtenidos de distintos niveles antero-posteriores desde +1.00 mm desde Bregma (zona 2), +0.2 mm (zona 3), -0.3 mm (zona4), -0.92 mm (zona 5), -1.4 mm (zona 6) hasta -1.8 mm (zona 7), utilizando el objetivo 10X. El área ocupada por las fibras TH⁺ fue expresada como un porcentaje del área total del estriado de

la sección coronal. El número de células TH⁺ en la SNpc fue valorado siguiendo la metodología descrita en el apartado 8.3.1.

9. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

9.1 Preparación de extractos tisulares para Western Blot

9.1.1 Disección del tejido

Las ratas se anestesiaron con una mezcla de oxígeno e isoflurano al 4% y a continuación se sacrificaron por decapitación con guillotina. Rápidamente se extrajo el cerebro para su procesamiento y se diseccionaron las distintas regiones cerebrales siguiendo la metodología descrita por Carlsson y Lindqvist (Carlsson y Lindqvist. 1973). Una vez disecado el tejido (estriado y zona enriquecida en mesencéfalo), éste se procesó inmediatamente o se almacenó a -80° C para su posterior utilización. La manipulación del tejido y el procesado posterior se realizó siempre a 4°C.

9.1.2 Procesado del tejido

El estriado y el mesencéfalo se homogeneizaron manualmente con un homogeneizador vidrio-vidrio tipo *Dounce* en proporción 1:8 (p:v) empleando un tampón de homogeneización isotónico (pH 7,6) compuesto por Tris-HCL 20 mM, KCl 140 mM, Mg(CH₃COO)₂ 5mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, EGTA 2 mM, Tritón X-100 al 0,5%, pepstatina A 10 µg/ml, leupeptina 10 µg /ml, antipaína 10 µg/ml, benzamidina 2 mMβ - glicerofosfato 20 mM, molibdato sódico 20 mM y ortovanadato sódico 200 µM.

El tejido homogeneizado en tampón isotónico se centrifugó a 11.000g a 4°C durante 20 minutos (Centrífuga eppendorf, Mod. 5415R, Alemania) y se separó el sobrenadante. Posteriormente, se hicieron alícuotas que se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

9.2 Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el método de BCA (BCA protein assay kit, Pierce). El ensayo de BCA combina el principio de la reducción por parte de las proteínas del ión Cu^{+2} a ión Cu^{+1} en presencia de medio alcalino (reacción de Biuret) con la alta sensibilidad de detección colorimétrica de los cationes Cu^{+1} por el ácido bicinconínico (BCA). El producto de la reacción de este ensayo se forma por la interacción de dos moléculas de BCA con una molécula de ión cuproso Cu^{+1} . Este compuesto presenta absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. Se realizó una curva patrón con albúmina de suero bovino (BSA) 2 mg/ml con concentraciones crecientes desde 62,5 $\mu\text{g/ml}$ hasta 2 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 37° C durante 30 minutos en un horno de hibridación (Stuart Scientific, Mod. SI20 H, Reino Unido). Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un lector de placas automático (Tecan, Mod. F200, Grödig, Austria).

9.3 Técnicas de separación y análisis de proteínas (Western blot)

9.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida se llevó a cabo utilizando un sistema de electroforesis analítica vertical de proteínas (BIO-RAD, Mod. Tetra Cell, California, EEUU). Para llevar a cabo la electroforesis disociante se emplearon geles de poliacrilamida de 1 mm de grosor en presencia de dodecil-sulfato-sódico (SDS) al 0,1%. Como agentes polimerizantes se utilizaron N-N-N'-N'-tetrametilen-diamina al 0,86% y persulfato amónico 2,14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Las muestras se prepararon en el tampón de carga (Tris-HCl 60 mM, SDS 3%, β -mercaptoetanol 2%, glicerol 5% y azul de bromofenol 0,0083%) (pH 6,8). Se cargaron 30 μg de proteína de cada muestra y se resolvieron a 200 V durante 1 hora utilizando una fuente de alimentación (BIO-RAD, Mod. Power Pack Basic, California, EEUU). El tampón empleado para desarrollar la electroforesis fue Tris-Glicina (Tris 250 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1%) (pH 8,3).

9.3.2 Transferencia a membrana

Las proteínas separadas por electroforesis (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa de 0,45 μm (Hybond-ECL, GE Healthcare).

El sistema de transferencia utilizado fue un sistema de transferencia continuo y en húmedo (BIO-RAD, Mod. Mini Trans-blot module, California, EEUU) en el que se utilizó el tampón: Tris-Glicina/Metanol (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%) (pH 8,3). El sistema se preparó de la siguiente manera: con todos los elementos sumergidos en tampón de transferencia, sobre el ánodo se colocó una esponja, a continuación cuatro papeles de transferencia seguidos del gel, la membrana de Nitrocelulosa (previamente embebida en tampón de transferencia), otros cuatro papeles de transferencia y otra esponja. La cubeta se llenó de tampón y la transferencia del sistema se realizó durante 1 hora a voltaje constante de 100V y a 4° C usando una fuente de alimentación (BIO-RAD, Mod. Power Pack Basic, California, EEUU).

9.3.3 Inmunodetección

Una vez que las proteínas se han resuelto y transferido correctamente, se detectan mediante el uso de anticuerpos específicos.

Anticuerpo	PM (KDa)	Tipo	Título	Casa comercial
β-Actina	42	monoclonal de ratón	1/5000	Sigma Aldrich
Bax	23	policlonal de conejo	1/300	Santa Cruz Biotech.
Bcl-2	29	monoclonal de ratón	1/400	Santa Cruz Biotech.
DAT	80	policlonal de conejo	1/500	Chemicon
ERK1/2	42/44	policlonal de conejo	1/10000	Sigma
ERK1/2 di(Thr183Tyr185P)	42/44	monoclonal de ratón	1/5000	Sigma
GFAP	50	policlonal de conejo	1/5000	Dako
Glut-5	60	policlonal de conejo	1/500	Abcam
OX6	29	monoclonal de ratón	1/1000	AbD Serotec
fosfo-CREB (Ser133)	43	policlonal de conejo	1/1000	Upstate
PCNA	36	policlonal de conejo	1/1000	Santa Cruz Biotech.
TH	52	monoclonal de ratón	1/5000	Chemicon
TNF-α	17	policlonal de cabra	1/400	Santa Cruz Biotech
TNF-α	17	policlonal de conejo	1/2500	AbD Serotec
VMAT-2	55	policlonal de conejo	1/1000	Alpha Diagnostics

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados en *Western blot*. (PM: Peso molecular).

Se llevaron a cabo dos protocolos generales de inmunodetección, dependiendo del método de revelado empleado:

9.3.4 Revelado por quimioluminiscencia

La membrana de nitrocelulosa, antes ser incubada con el anticuerpo primario, se bloqueó durante 1 hora con blotto al 5% en PBS 0,1 M (pH 7,4). Los anticuerpos fueron diluidos en PBS-blotto al 1% y se incubaron con la membrana toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón (1/2000) (GE Healthcare), de conejo (1/2000) (GE Healthcare) o de cabra (1/2000) (Santa Cruz Biotech.), conjugados con peroxidasa de rábano, se diluyeron en PBS-blotto al 1% y se incubaron con la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. Entre las incubaciones con los anticuerpos y antes del revelado, la membrana se lavó 3 veces durante 10 minutos con Tween 0,05% en PBS 0,1 M (pH 7,4).

Para desarrollar el revelado, se utilizó el procedimiento y los reactivos recomendados por el fabricante de ECLTM (GE Healthcare), Bio-Rad Immun-Star HRP Substrate ó Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate. Se empleó un sistema de quimioluminiscencia en el que la emisión de la luz es captada en una placa fotográfica (Amersham HyperfilmTM ECL). Después de llevar a cabo diferentes tiempos de exposición de la membrana, la película se introdujo en una reveladora automática (Fujifilm, Mod. FPM-100A, Tokio, Japón).

9.3.5 Revelado del control de carga con fosfatasa alcalina

Para llevar a cabo la inmunodetección de la proteína β -Actina (control de carga), se bloqueó la membrana con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en PBS 0,1 M (pH 7,4) durante 1 hora. El anticuerpo primario anti- β -Actina (Sigma) (1/5000) se diluyó en PBS-BSA al 1% para la incubación de la membrana durante una hora a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido (1/3000) en PBS-BSA al 1% con el que se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces durante 10 minutos con PBS-Tween al 0.05% entre las incubaciones con los anticuerpos. La actividad fosfatasa alcalina se reveló con azul de nitrotetrazolio/x-fosfato (NBT) 0,3 mg/ml y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 0,15mg/ml, ambos diluidos 1/100 en tampón AP

(Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM) (pH 9,5). La reacción se detuvo con H₂O miliq.

9.3.6 Re-inmunodetección

Para los experimentos en los que se necesitó detectar varios anticuerpos en la misma membrana, como en los casos de detección de los niveles fosforilados y totales de una proteína, antes de proceder a la re-inmunodetección, se incubó la membrana durante 45 minutos a 50°C con Glicina 1M, pH 3,1 para eliminar el anticuerpo primario y secundario de la primera inmunodetección.

9.3.7 Análisis densitométrico

Una vez detectadas las bandas correspondientes a las proteínas de interés, se realizó su análisis empleando un analizador de imagen equipado con el paquete informático Image Quant TL (GE Healthcare, Reino Unido). Los datos se obtuvieron en unidades de densidad óptica/mm² y fueron corregidos por el control de carga (β -actina). Los datos correspondientes a fosforilación siempre se expresaron relativos a la cantidad total de la proteína estudiada.

9.4 Determinación de la concentración de dopamina por HPLC

Los niveles de DA fueron analizados mediante la técnica de HPLC descrita previamente por Mena y colaboradores (Mena y cols. 1995). El tejido fue homogeneizado en ácido perclórico 0,4 N en proporción 1:8 (p:v) mediante un homogeneizador vidrio-vidrio tipo *Dounce* y se centrifugó durante 20 min a 12000 rpm, 4°C. El pellet fue utilizado para determinar la concentración de proteínas mediante el método descrito en el apartado 9.2 y el sobrenadante, previamente filtrado (filtro Millex 0,45 μ m de Millipore Co, Bedford, MA, EEUU), se destinó para el análisis de la concentración de DA por HPLC (JASCO, Mod. PU-2080 Japón) utilizando un detector electroquímico equipado a su vez con una célula analítica modelo 5011A y una célula de condicionamiento modelo 5021A (ESA Coulochem III, Chelmsford, MA, EEUU). Las condiciones de voltaje de las células electroquímicas del detector fueron E1 +400 mV y E2 +50 mV. Se utilizó una columna C18 (150 x 4.6 mm) de 5 μ m (ACE Aberdeen, Escocia) y la fase móvil estaba compuesta

por tampón citrato/acetato 0,1 M, pH 3.9 con metanol 10%, EDTA 1 mM y ácido heptanosulfónico 4,8 mM. El flujo fue fijado a 1 ml/min.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados fueron expresados como la media \pm EEM (error estándar de la media) de (n) animales independientes. Los análisis estadísticos se realizaron con los tests de t-Student, ANOVA de una ó dos vías y el test para comparaciones múltiples de Newman-Keuls, considerándose que la diferencias eran significativas cuando $p \leq 0,05$. Para llevar a cabo el análisis de los datos y la obtención de gráficos, se utilizó el programa Prism 4 (GraphPad software, California, EEUU).

VI.-RESULTADOS

1. INFUSIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE LGF

1.1 La infusión ICV de LGF estimula la proliferación celular y la expresión de Nestina en la ZSV de ratas lesionadas con 6-OHDA.

La infusión intracerebral de factores tróficos estimula la proliferación de los precursores neurales localizados en la ZSV de los ventrículos laterales de los roedores. Los animales lesionados unilateralmente con 6-OHDA (control de la lesión) mostraron inmunorreactividad para PCNA en las regiones dorsales y centrales de la ZSV (Figuras 13A y 13D), mientras que casi no se hallaron células PCNA+ en los niveles mas ventrales (Figura 13G). Sin embargo, la infusión ICV durante 7 días de LGF (ICV-LGF 7d) aumentó el número de células PCNA+ en todos los niveles de la ZSV infundida (Figuras 13C, 13F y 13I). También se observaron células PCNA+ dentro del parénquima estriatal y en el septum de las ratas tratadas con LGF (Figuras 13F y 13I). Los animales con infusión ICV de vehículo durante 7 días (ICV-vehículo 7d) mostraron un incremento de la proliferación celular en las regiones dorsales y centrales de la ZSV (Figuras 13B y 13E) pero el efecto fue significativamente menos marcado que el observado en el grupo ICV-LGF 7d.

La proteína nestina forma parte de los filamentos intermedios y es usada como marcador biológico en la identificación de células progenitoras (Lendahl y cols. 1990; Ernst y Christie. 2005). Los animales pertenecientes al grupo control de la lesión mostraron inmunorreactividad para nestina en la ZSV (Figuras 13A, 13D y 13G). La infusión ICV de vehículo durante 7 días incrementó la expresión de nestina en las regiones dorsales y centrales de la ZSV (Figura 13B y 13E), mientras que en las zonas ventrales no se observó ningún cambio significativo (Figura 13H). Los animales tratados con LGF durante 7 días mostraron un aumento significativo en el marcaje para nestina en toda la ZSV (Figuras 13C, 13F, y 13I). Además, el LGF expandió la población de células positivas para nestina dentro del parénquima estriatal, región donde a su vez se halló una cantidad destacable de células doblemente marcadas para PCNA y nestina. (Inserto en figura 13F)

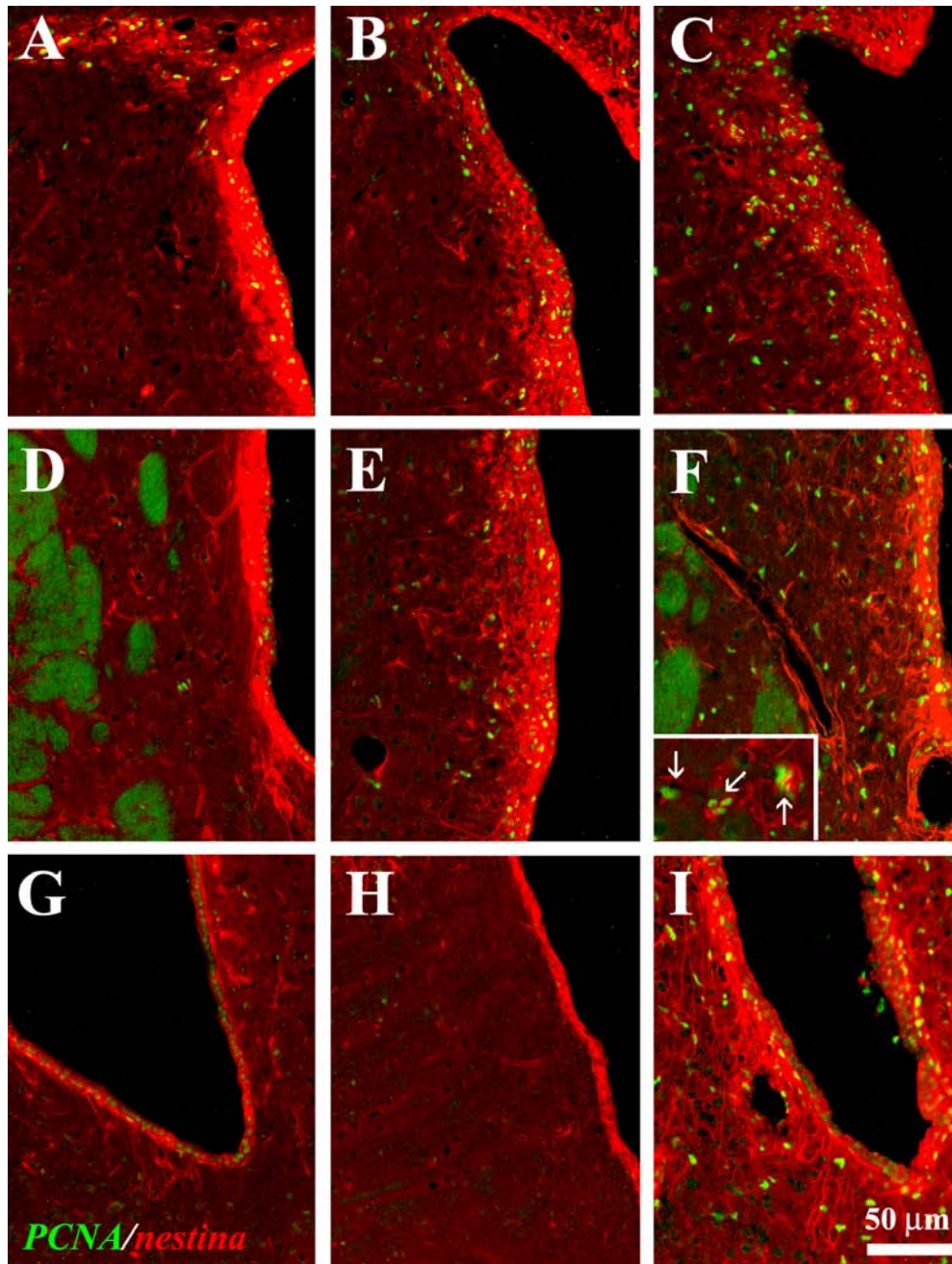


Figura 13. El factor de crecimiento de hígado estimula la proliferación celular y la expresión de Nestina en ratas lesionadas con 6-OHDA. La ZSV y el estriado denervado de las ratas hemiparkinsonianas que recibieron la infusión ICV de LGF durante 7 días (C, F, I) mostraron una mayor inmunorreactividad frente a PCNA+ (verde) y una mayor expresión de nestina (rojo) en comparación con los animales control de la lesión (A, D, G) y con los animales del grupo ICV-vehículo 7d (B, E, H). Este efecto fue observado en las regiones dorsales (A-C), mediales (D-F) y ventrales (G-I) de la pared de los ventrículos laterales. Nótese la existencia de células doblemente marcadas para PCNA y nestina invadiendo el estriado lesionado de los animales ICV-LGF 7d (Flechas en inserto en F). Barra de la escala; 50 µm (A-I).

La expresión de nestina y de PCNA también fue analizada en la ZSV de un grupo de ratas sin lesión que recibieron una infusión ICV durante 7 días de vehículo (Sanas-ICV-Vehículo 7d) ó LGF (Sanas-ICV-LGF 7d). La inmunorreactividad para PCNA fue similar tanto en el lado infundido como en el lado contralateral de los animales sanos tratados con vehículo. La infusión ICV de LGF en los animales sin lesión incrementó ligeramente la proliferación celular en el lado infundido en 3 de los 7 animales analizados independientemente (dato no mostrado). El efecto proliferativo hallado en estos 3 animales pudo ser debido al daño observado en la ZSV, en el estriado y en el septum por la inserción de la cánula. Por otro lado, ni los animales del grupo Sanas-ICV-Vehículo 7d, ni los animales del grupo Sanas-ICV-LGF 7d mostraron un incremento en la expresión de nestina en la ZSV ó en el número de células nestina+ en el parénquima estriatal. (dato no mostrado). Estos resultados indican que el LGF, en ausencia de lesión, no es capaz de estimular la proliferación de la población celular positiva para nestina ni su migración desde la ZSV.

El estudio de los efectos de la administración ICV de LGF en el grupo de animales que fue sacrificado 15 días después del fin de la infusión (ICV-LGF 30d), reveló un incremento de la incorporación de BrdU en la ZSV, el parénquima estriatal, el septum y el cuerpo calloso del lado infundido ipsilateral a la lesión (dato no mostrado). Además, de manera similar a lo observado en el grupo ICV-LGF 7d, se hallaron células nestina+ en proliferación (BrdU+) en el parénquima estriatal de los animales ICV-LGF 30d.

1.2 El LGF promueve la proliferación de los neuroblastos y su migración en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA.

Los precursores neurales de la ZSV dan lugar a una población de nuevas neuronas cuyo destino final es integrarse en el bulbo olfatorio. La inmunotinción para DCX en los animales lesionados e infundidos en el ventrículo lateral con vehículo durante 15 días (ICV-Vehículo 15d) reveló la existencia de agrupaciones de células positivas para DCX en la ZSV (Figura 14A). La mayoría de estas células DCX+ estaban a su vez marcadas para nestina (Figura 15A), indicando que estas células pertenecían a la población celular de precursores neurales localizados en la ZSV de los ventrículos laterales (Yang y cols. 2004). La administración de vehículo durante 15 días en el ventrículo lateral de los animales lesionados con 6-OHDA no modificó el número de células DCX+ ni en el lado infundido

Resultados

[$30 \pm 6,2$ células DCX+/mm², (n=5)] ni en el lado sin infusión [$27 \pm 3,7$ células DCX+/mm², (n=5)]. El estudio de la expresión de DCX, en las secciones en el nivel de la cánula de los animales ICV-Vehículo 15d, reveló que la distribución de las células DCX+ no varió ni en el lado infundido ni en el lado sin infusión. Sin embargo, la infusión ICV de LGF durante 15 días incrementó el número de células DCX+ en el lado infundido [$49 \pm 8,7$ células DCX+/mm², (n=5)], afectando a su vez a la distribución de dichas células.

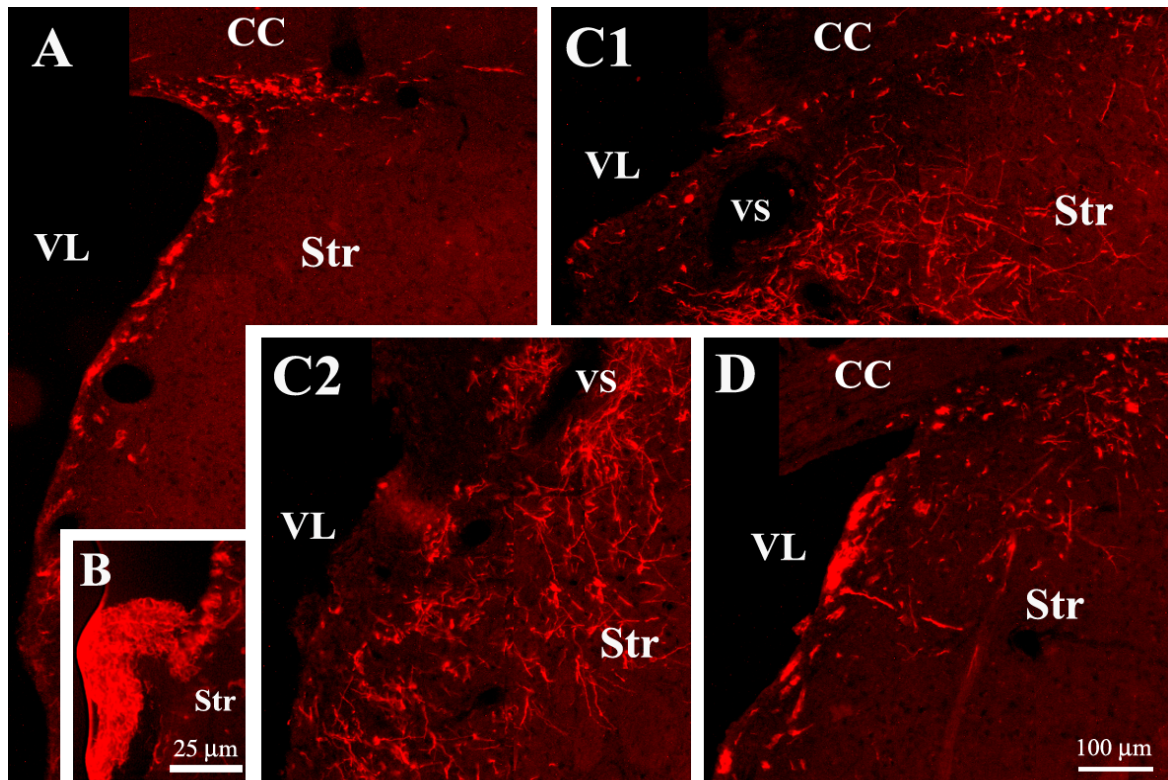


Figura 14. Actividad Neurogénica del LGF en ratas lesionadas con 6-OHDA. En A, C1, C2 y D se muestran fotocomposiciones de la ZSV y del estriado adyacente de ratas infundidas con vehículo (A) ó LGF (C1, C2 y D). Los neuroblastos positivos para doblecortina (DCX, en rojo) de los animales infundidos con vehículo durante 15 días se encontraron formando agrupaciones celulares en el asta dorso-lateral y en la ZSV (A). La infusión de LGF durante 15 días incrementó la inmunorreactividad para DCX en toda la ZSV y en las regiones dorsales (C1 y D) y ventrales (C2) del estriado. Nótese como los neuroblastos que invadieron el estriado mostraron la morfología característica de células en migración con largos procesos. El marcaje para DCX también fue observado en forma de protrusiones en los ventrículos laterales de los animales con infusión de LGF (B). CC, Cuerpo Calloso; Str, Estriado; VL, Ventrículo Lateral; VS, Vaso Sanguíneo. Barra de la escala; 25 μm (B) y 100 μm (A, C1, C2 y D).

En general, las células DCX+ fueron observadas en la región dorsal del estriado de los animales del grupo ICV-LGF 15d (Figura 14D). Sin embargo, algunos animales mostraron un número significativo de células DCX+ invadiendo las regiones dorsales (Figura 14C1) y ventrales (Figura 14C2) del parénquima estriatal. En los animales que recibieron la infusión ICV de LGF durante 15 días, las células DCX+ no coexpresaron ni Nestina (Figura 15B) ni GFAP (Figura 15G), pero sí que mostraron la morfología de células en migración con largos procesos. Además, el marcaje para DCX también fue hallado en forma de protrusiones en los ventrículos laterales de los animales con del grupo ICV-LGF 15d (Figura 14B).

Para determinar si hubo generación de nuevas células DCX+ durante la infusión ICV de LGF, un grupo de animales recibió inyecciones de BrdU intraperitoneal durante los 15 días que duró la infusión ICV de vehículo ó LGF. Al final del tratamiento, los animales fueron sacrificados y se llevaron a cabo los experimentos de doble inmunotinción para BrdU y antígenos neuronales. El análisis inmunohistoquímico de los animales ICV-LGF 15d mostró un incremento significativo en el número total de células BrdU+ en la ZSV y en el estriado lesionado en comparación con los animales ICV-Vehículo 15d (Figura 16A). Los experimentos de doble inmunomarcaje mostraron que el $25 \pm 5,6$ % (n=7) de las células BrdU+ halladas en el parénquima estriatal de los animales ICV-LGF 15d eran a su vez inmunopositivas para DCX. La mayoría de estas nuevas neuronas tenían una morfología redondeada y estaban localizadas cerca de la ZSV y de vasos sanguíneos (Figura 14C). Además, las células DCX+/BrdU+ con morfología de neuroblastos en migración, fueron también observadas en el estriado denervado de los animales del grupo ICV-LGF 15d (Figura 15C, inserto).

La proteína NeuN es un antígeno nuclear expresado por las neuronas maduras. Cabe destacar que el 31 ± 6 % (n=6) de los núcleos BrdU+ comarcaron con NeuN (Figuras 15D y 15E), indicando que las nuevas neuronas generadas pudieron diferenciarse hacia un fenotipo maduro en el estriado de los animales del grupo ICV-LGF 15d.

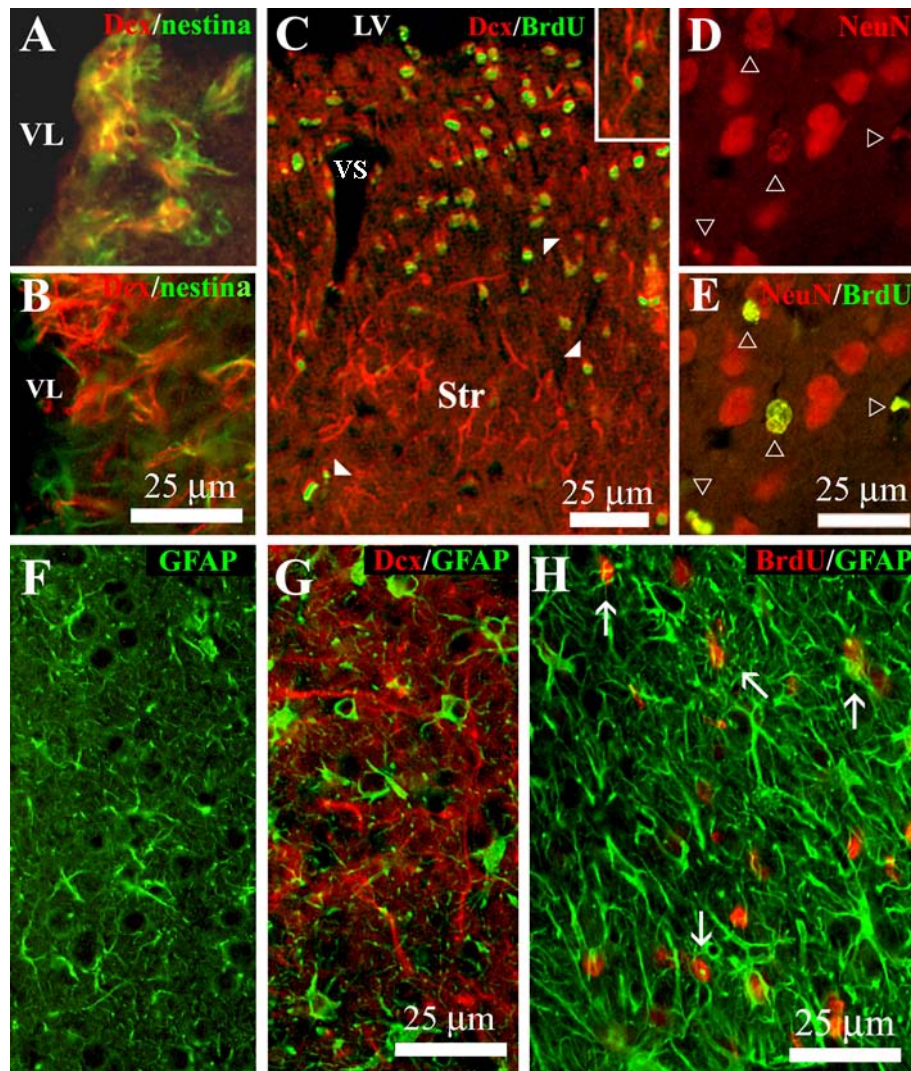


Figura 15. El LGF promueve la proliferación de Neuroblastos y la reactividad glial en ratas lesionadas con 6-OHDA. En A y en B se muestra la inmunorreactividad para Nestina (verde) y Doble cortina (rojo) en animales infundidos durante 15 días con vehículo (A) ó LGF (B). Nótese que en el grupo LGF las células DCX+ no comarcaron con Nestina (B). En C se muestra como los neuroblastos DCX+ (rojo) que coexpresaron BrdU (verde) se localizaron en el estriado de los animales infundidos con LGF. La mayoría de los neuroblastos de nueva generación que invadieron el estriado mostraron una morfología redondeada (C, puntas de flecha blancas) y solo algunos presentaron procesos alargados (C, inserto). Las neuronas NeuN+ (D y E; en rojo, triángulos abiertos blancos) que comarcaron con BrdU solo fueron observadas en el grupo infundido con LGF (E, amarillo). Los astrocitos GFAP+, hallados en los animales del grupo LGF, mostraron hipertrofia del cuerpo celular (G, verde) y coexpresaron BrdU (H, rojo) en comparación con lo observado en el grupo vehículo (F, verde). En cambio, estas células no expresaron DCX (G, rojo). Str, Estriado; VL, Ventrículo Lateral; VS, Vaso Sanguíneo. Barra de la escala; 25 μm (AH).

Otra población celular que proliferó debido a la infusión de LGF durante 15 días fue la compuesta por los astrocitos positivos para la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP). Estos astrocitos en proliferación representaron el $24 \pm 2 \%$ ($n=10$) del total de la población de células BrdU+ observadas en el estriado (Figura 15H). La inmunotinción

frente a GFAP reveló la presencia de astrocitos con procesos alargados en los animales del grupo ICV-vehículo 15d (Figura 15F). En cambio, las células GFAP+ halladas en el parénquima estriatal, de los animales que recibieron la infusión ICV de LGF durante 15 días, mostraron hipertrofia del cuerpo celular (Figura 15G). Estos efectos sobre la expresión de GFAP hallados en el grupo ICV-LGF 15d fueron similares a lo observado en los animales ICV-LGF 30d (dato no mostrado). Los resultados sugieren que la infusión ICV de LGF en los animales lesionados con 6-OHDA promueve la reactividad glial. Además de las neuronas y de los astrocitos, el $22 \pm 2 \%$ ($n=7$) de las células BrdU+ halladas en el estriado de los animales ICV-LGF 15d comarcaron a su vez con Nestina (Figura 17B). Aproximadamente, el 5% de esas células fueron localizadas en vasos sanguíneos y mostraron la típica morfología de célula endotelial (Figura 17B, inserto).

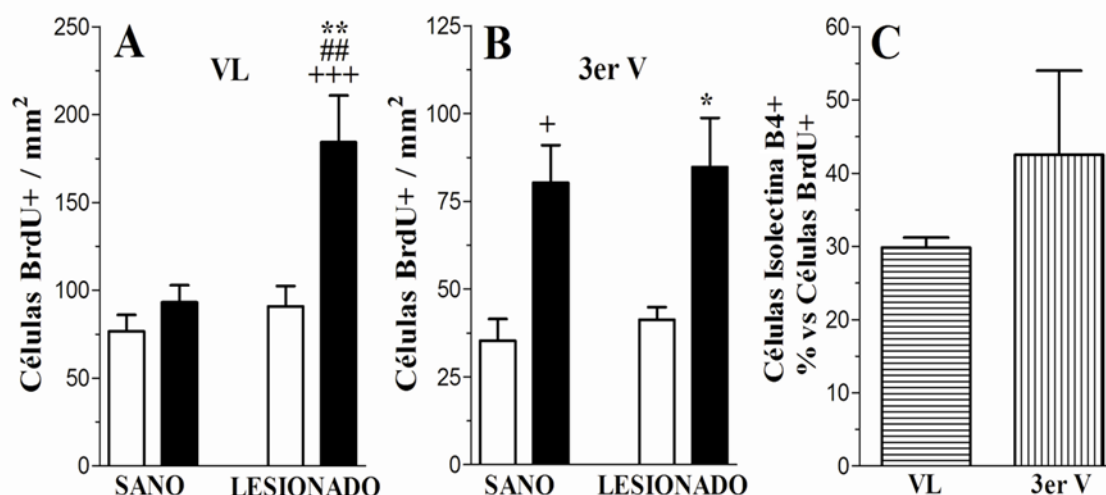


Figura 16. El LGF incrementa la incorporación de BrdU en ratas lesionadas con 6-OHDA.

La infusión ICV de LGF durante 15 días incrementó significativamente el número total de células BrdU+ tanto en la ZSV como en el estriado lesionado e ipsilateral a la infusión de LGF (A, LESIONADO, barra negra) en comparación con el lado sano contralateral no infundido (A, SANO, barra negra) y con ambos lados del grupo vehículo (A, SANO y LESIONADO, barras blancas). Nótese como la infusión ICV de vehículo durante 15 días no afectó a la proliferación ni en el lado lesionado infundido (A, LESIONADO, barra blanca) ni en el lado sano no infundido (A, SANO, barra blanca). Además, el LGF estimuló la proliferación alrededor del tercer ventrículo (3er V) y del hipotálamo adyacente (B, SANO y LESIONADO, barras negras). En C se representa el porcentaje de células BrdU+ que coexpresaron Isolectina B4 (marcador de microglía / macrófagos) en la pared del ventrículo lateral (barra con líneas horizontales) y en la pared del tercer ventrículo (barra con líneas verticales) de las ratas del grupo ICV-LGF 15d. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 a 6 animales independientes. $^+p \leq 0,05$ y $^{+++}p \leq 0,001$ vs lado sano (sin infusión) de los animales infundidos con vehículo. $^*p \leq 0,05$ y $^{**}p \leq 0,01$ vs lado lesionado (infundido) de los animales infundidos con vehículo. $^{##}p \leq 0,01$ vs lado sano (sin infusión) de los animales infundidos con LGF. VL, Ventrículo Lateral; 3er V, tercer ventrículo.

1.3 El LGF estimula la proliferación de la microglía en los ventrículos laterales y en el tercer ventrículo de ratas lesionadas con 6-OHDA.

Como se muestra en la figura 17, se observaron engrosamientos con células BrdU+ en los ventrículos laterales de los animales del grupo ICV-LGF 15d. Estas células estaban separadas del parénquima estriatal por una capa de células endimarias positivas para S-100 y GFAP (Figuras 17D y 17E). En estas estructuras se detectó inmunorreactividad para DCX y GFAP, pero los experimentos de doble inmunomarcage revelaron que solo un pequeño número de células BrdU+ comarcaron con DCX (Figura 17C) ó GFAP (Figura 17E). Además, ninguna de estas células BrdU+ fueron a su vez Nestina+ (Figura 17B) ó S-100+ (Figura 17D).

Dado que la ZSV contiene microglía, estas células pudieron ser estimuladas durante la infusión ICV de LGF de 15 días de duración. En la figura 17F se muestra la presencia de células con morfología redondeada y positivas para IB4 [(marcador de microglía / macrófagos) (Streit. 1990; Boya y cols. 1991)]. Estas células fueron halladas en las estructuras proliferantes de los ventrículos laterales de los animales del grupo ICV-LGF 15d. Además, esta población celular IB4+ comarcó con BrdU y representó casi un 30% del total de células BrdU+ encontradas en esas estructuras de los ventrículos laterales (Figura 16C).

El LGF también fue capaz de estimular la proliferación de la microglía en el tercer ventrículo. En la figura 16B se muestra el incremento significativo de incorporación de BrdU observado en ambos lados de la pared lateral del tercer ventrículo de los animales del grupo ICV-LGF 15d en comparación con los animales del grupo ICV-Vehículo 15d. Además, los experimentos de doble marcage revelaron que mas del 40% de estas células BrdU+ comarcaron con células redondeadas IB4+ (Figuras 16C y 17G).

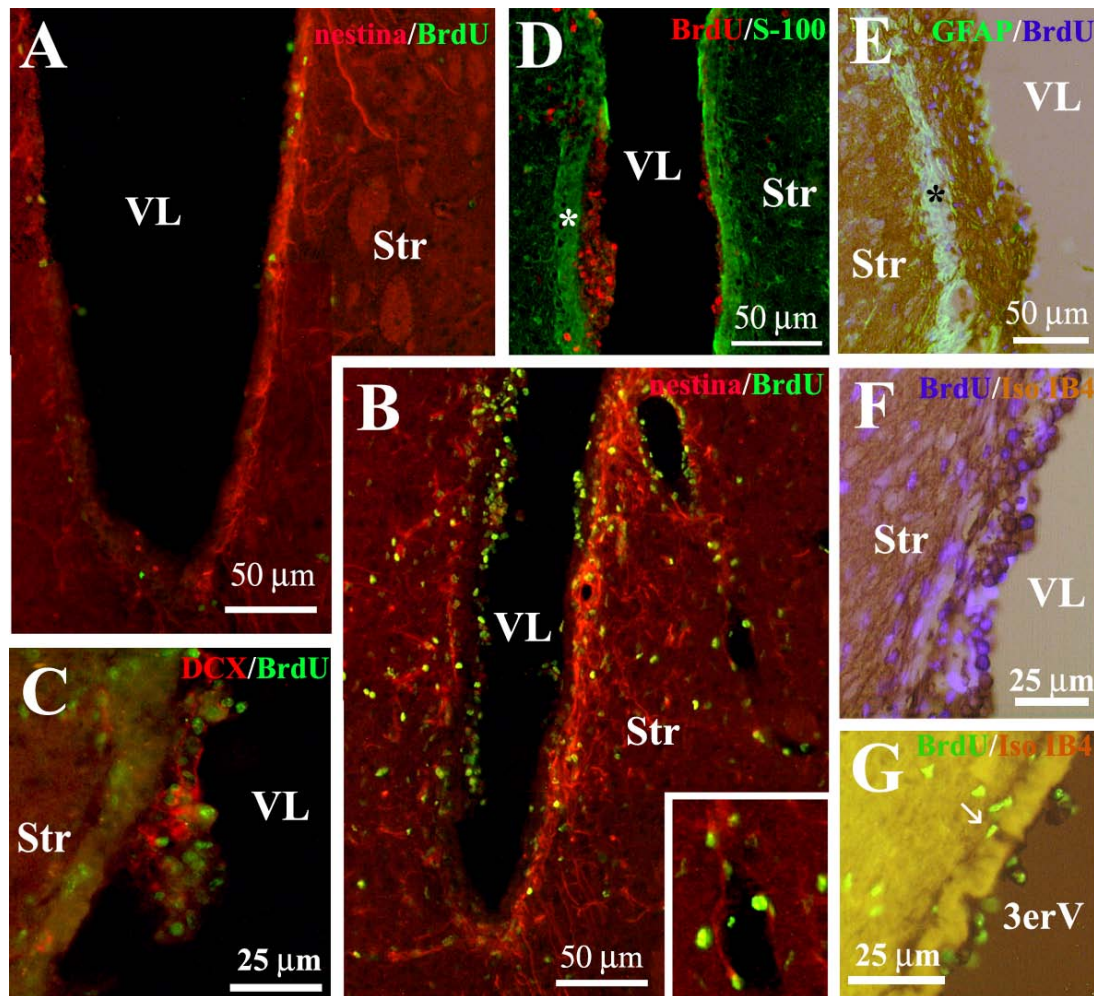


Figura 17. El LGF estimula la proliferación de la microglía dentro del lumen de los ventrículos laterales y del tercer ventrículo de ratas lesionadas con 6-OHDA. Como se muestra en B, las células BrdU+ invadieron el estriado de los animales del grupo ICV-LGF 15d en comparación con el grupo ICV-vehículo 15d (A). Nótese que algunas células fueron Nestina+ (B, rojo) y mostraron morfología de célula endotelial (B, inserto). Los engrosamientos luminales con células BrdU+ se localizaron dentro de los ventrículos laterales de los animales infundidos con LGF (B y C, verde; D, rojo; E y F, azul). Estos engrosamientos estaban separados del estriado por células endociliales inmunopositivas para S-100 (D, verde, estrella blanca) y para GFAP (E, verde, estrella negra). Numerosas células BrdU+ que se hallaban dentro de los ventrículos laterales fueron a su vez Isolectina IB4+ (E y F, marrón), algunas coexpresaron DCX (C, rojo) y ninguna fue Nestina+ (B, rojo). También se observaron células BrdU+ / Isolectina IB4+ invadiendo el lumen del tercer ventrículo de los animales infundidos con LGF (G, verde y marrón, flecha blanca). Str, Estriado; 3erV, tercer ventrículo; VL, Ventrículo Lateral. Barra de la escala; 50 μm (A, B, D y E) y 25 μm (C, F y G).

1.4 Efectos de la infusión ICV de LGF sobre la innervación positiva para tirosina hidroxilasa.

Los animales que fueron sacrificados tras finalizar la infusión ICV durante 7 ó 15 días de LGF (ICV-LGF 7d ó 15d) y los animales cuyo período de infusión ICV de LGF fue de 15 días pero que fueron sacrificados 30 días después del inicio de la infusión (ICV-LGF 30d), no mostraron cambios en la expresión de TH en el estriado en comparación con los observado en los grupos con infusión de vehículo (dato no mostrado). Además, no se observaron neuronas TH+ ni TH+ / BrdU+ en el parénquima estriatal de los animales con infusión ICV de LGF durante estos tiempos. Por otro lado, tampoco se apreciaron cambios en el número total de neuronas TH+ ni TH+ / BrdU+ en la SNpc en los diferentes grupos experimentales con infusión ICV de LGF en comparación con los del grupo ICV-Vehículo.

1.5 La infusión ICV de LGF no mejora la función motora.

Para determinar si la administración intracerebroventricular de LGF era capaz de restaurar la función motora en los animales lesionados con 6-OHDA, se evaluaron las rotaciones inducidas por apomorfina una vez por semana hasta el sacrificio de los animales. Los animales pertenecientes a los grupos ICV-LGF 15d e ICV-LGF 30d no mostraron ningún cambio significativo en la conducta rotacional inducida por apomorfina en comparación con los grupos con infusión de vehículo (dato no mostrado). Estos resultados indican que la administración ICV de LGF no fue capaz de mejorar la función motora, en el modelo experimental de EP por lesión de la vía nigroestriatal con 6-OHDA, durante el período de tratamiento analizado en este estudio.

2. INFUSIÓN INTRAESTRIATAL DE LGF

2.1 Efectos de la infusión IS de LGF sobre la innervación dopaminérgica

El grupo de animales control de la lesión fue sacrificado 6 semanas después de la lesión para evaluar el grado de degeneración de la proyección dopaminérgica nigroestriatal existente antes del inicio de la infusión IS de LGF o vehículo.

El análisis inmunohistoquímico de las secciones coronales de dos niveles diferentes del estriado mostró que los animales pertenecientes al grupo control de la lesión, que únicamente habían sido lesionados unilateralmente con 6-OHDA en la vía nigroestriatal, no contenían neuronas TH⁺ estriatales y que solo el $5,5 \pm 1,9\%$ de la estructura correspondiente a la región más ventral del estriado mostró innervación TH⁺. Sin embargo, la infusión IS de LGF durante 15 días en animales lesionados con 6-OHDA incrementó la innervación TH⁺ en las regiones centrales y ventromediales del estriado y alrededor de la zona de infusión de la cánula (Figuras 18A-18F). El efecto observado en el nivel estriatal correspondiente a la zona de infusión del grupo IS-LGF 15d (Figura 19A) difirió significativamente del encontrado en los grupos vehículo y control de la lesión.

La generación de nuevas neuronas dopaminérgicas podría explicar el incremento en la innervación TH⁺ observado. Sin embargo, ninguno de los grupos experimentales mostró neuronas TH⁺ ó células doblemente marcadas para β -tubulina III / BrdU ó TH / BrdU en el estriado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA.

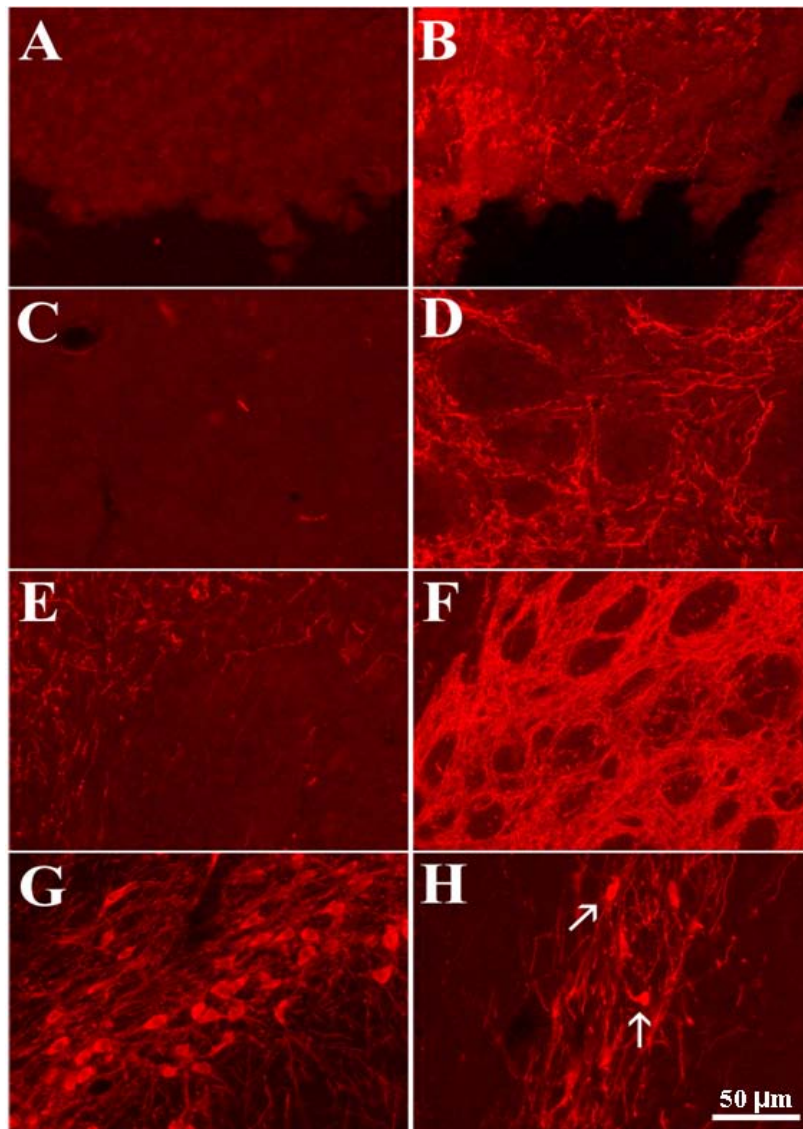


Figura 18. La infusión IS de LGF induce la expresión de TH en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. Seis semanas después de la lesión, se infundió en el estriado lesionado vehículo (A, C y E) ó LGF (160 ng/día/rata) (B, D, y F) durante 15 días. Dos semanas después del fin de la infusión, los animales fueron sacrificados y se llevó a cabo la inmunotinción frente a TH. La infusión IS de LGF aumentó la innervación TH+ alrededor de la zona de infusión de la cánula (B) y en las regiones centrales (D) y ventromediales (F) del estriado ipsilateral a la lesión. La inmunotinción frente a TH en la SNpc de las ratas lesionadas se muestra en G y H. Nótese que después de 6 semanas de lesión (grupo control de la lesión) se hallaron pocas neuronas TH+ en la SNpc lesionada (flechas en H) en comparación con la del lado sano (G). Barra de la escala; 50 µm (A-H).

En la SNpc, la lesión con 6-OHDA disminuyó significativamente el número de neuronas TH+ en comparación con el lado sano (Figuras 18G y 18H, respectivamente). La infusión de LGF no afectó al número total de neuronas TH+ cuando se comparó con los animales vehículo y control de la lesión (Figura 19B). Por otro lado, aunque se encontraron

algunos núcleos BrdU+ en la SNpc, ninguna de las neuronas TH+ observadas incorporaron BrdU ni en lado ipsilateral ni en lado contralateral de la estructura.

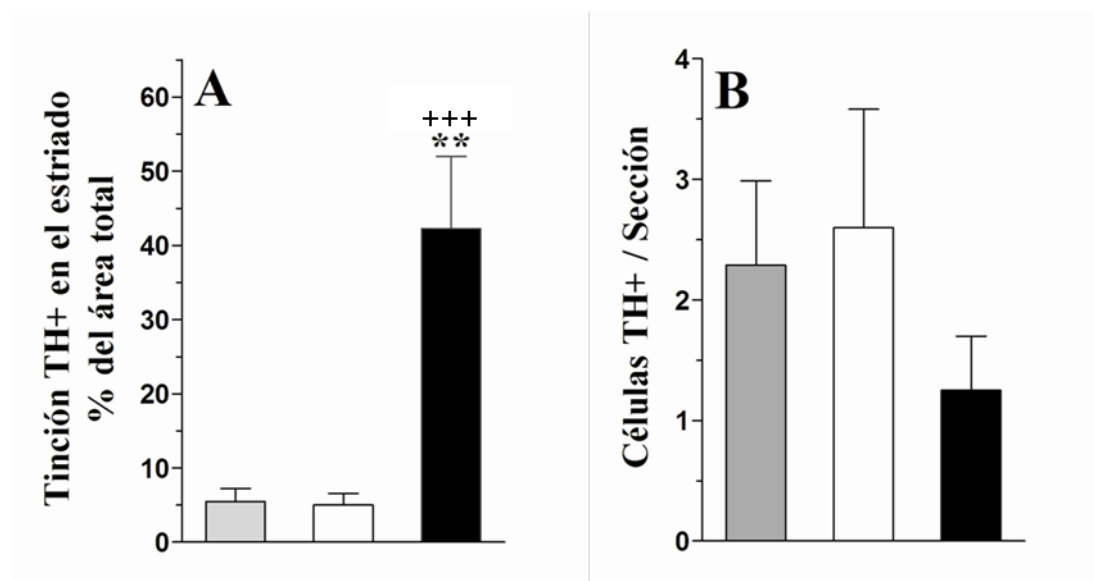


Figura 19. Efectos de la infusión IS de LGF en la expresión de TH. Seis semanas después de la lesión, los animales se dividieron en distintos grupos de acuerdo con la sustancia infundida durante 15 días en el estriado: vehículo (barras blancas), LGF (160 ng/día/rata) (barras negras), y animales del grupo control de la lesión (barras grises). Transcurridos 15 días después del fin de la infusión, los animales fueron sacrificados y se llevó a cabo la inmunotinción frente a TH en el estriado (A) y en la SNpc (B). La innervación TH+ del grupo IS-LGF 15d, en el área del estriado correspondiente a la zona de infusión, aumentó significativamente con respecto a todos los grupos analizados (A). Como se muestra en B, los animales IS-LGF 15d no mostraron diferencias significativas en el número de neuronas TH+ en la SNpc lesionada cuando se compararon con el grupo IS-vehículo o con el grupo control de la lesión. El número de neuronas TH+ en la SNpc no lesionada fue $110 \pm 3,2$ neuronas TH+/sección ($n=7$). Los resultados representan la media \pm EEM de 5 animales IS-vehículo 15d, 9 IS-LGF 15d y 9 control de la lesión. ** $p \leq 0.01$ vs grupo IS-vehículo 15d (barra blanca), +++ $p \leq 0.01$ vs grupo control de la lesión (barra gris).

2.2 La infusión IS de LGF restaura parcialmente la función motora

Para determinar si la administración intraestriatal de LGF podría restaurar la función motora de los animales lesionados unilateralmente con 6-OHDA, se evaluó la conducta rotacional de estos animales antes, durante, y después del período de infusión. Como se muestra en la Figura 20, durante las 3 semanas previas al sacrificio de los animales, el grupo IS-LGF 15d mostró una ligera pero significativa reducción en la conducta rotacional inducida por apomorfina en comparación con el grupo de animales IS-vehículo 15d.

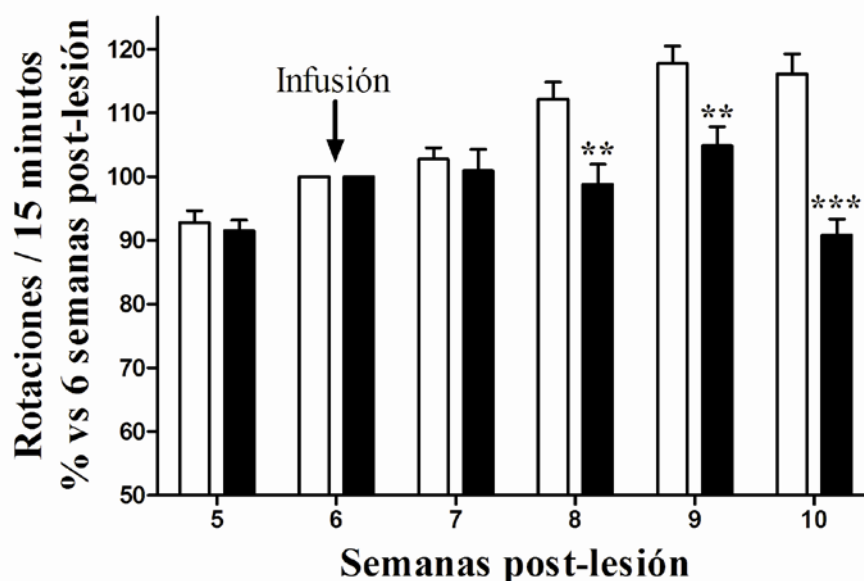


Figura 20. Efecto de la infusión IS de LGF sobre la conducta rotacional inducida por apomorfina. Estudio de la conducta rotacional inducida por apomorfina en el grupo de animales IS-LGF 15d (barras negras) y en el grupo IS-vehículo 15d (barras blancas). Nótese la ligera pero significativa disminución en el número de rotaciones observada en el grupo IS-LGF al final de los experimentos. El número de rotaciones durante 15 minutos a las 6 semanas post-lesión fue de 233 ± 22 ($n=14$). Los resultados representan la media \pm EEM de 5 animales IS-vehículo 15d y 9 IS-LGF 15d. ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$ vs grupo IS-vehículo 15d.

2.3 La infusión IS de LGF estimula la proliferación y la activación de la microglía en el estriado.

Debido a que administración ICV de LGF promovió la proliferación de la microglía y de los progenitores neurales, nos planteamos determinar si la infusión IS de LGF también era capaz de estimular la proliferación celular en los animales lesionados con 6-OHDA. Con este fin, se llevó a cabo la detección inmunohistoquímica del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, proteína que se expresa durante las fases G_0/G_1 y S del ciclo celular) después de 24 ó 48 horas de infusión IS de LGF. El factor de crecimiento de hígado produjo un aumento significativo en el número de células PCNA+ en el estriado ipsilateral a la infusión (Figura 21A). Además, el estudio mediante *Western blot* de la expresión de PCNA en el estriado lesionado, reveló que la administración IS de LGF durante 24 horas (IS-LGF 24H) incrementó la proliferación celular en comparación con el grupo IS-vehículo 24H (Figura 22A).

Paralelamente, el LGF promovió un incremento significativo del número total de células que expresaron IB4 en el estriado lesionado de los animales del grupo IS-LGF 48H

(Figura 21A). Cabe resaltar que el 60% de las células IB4+ comarcaron con PCNA en las regiones ventrales y centrales del estriado (Figuras 21C y 21D). Además, un gran porcentaje de estas células mostraron la morfología ameboide característica de la microglía activada (Figuras 21B y 21D).

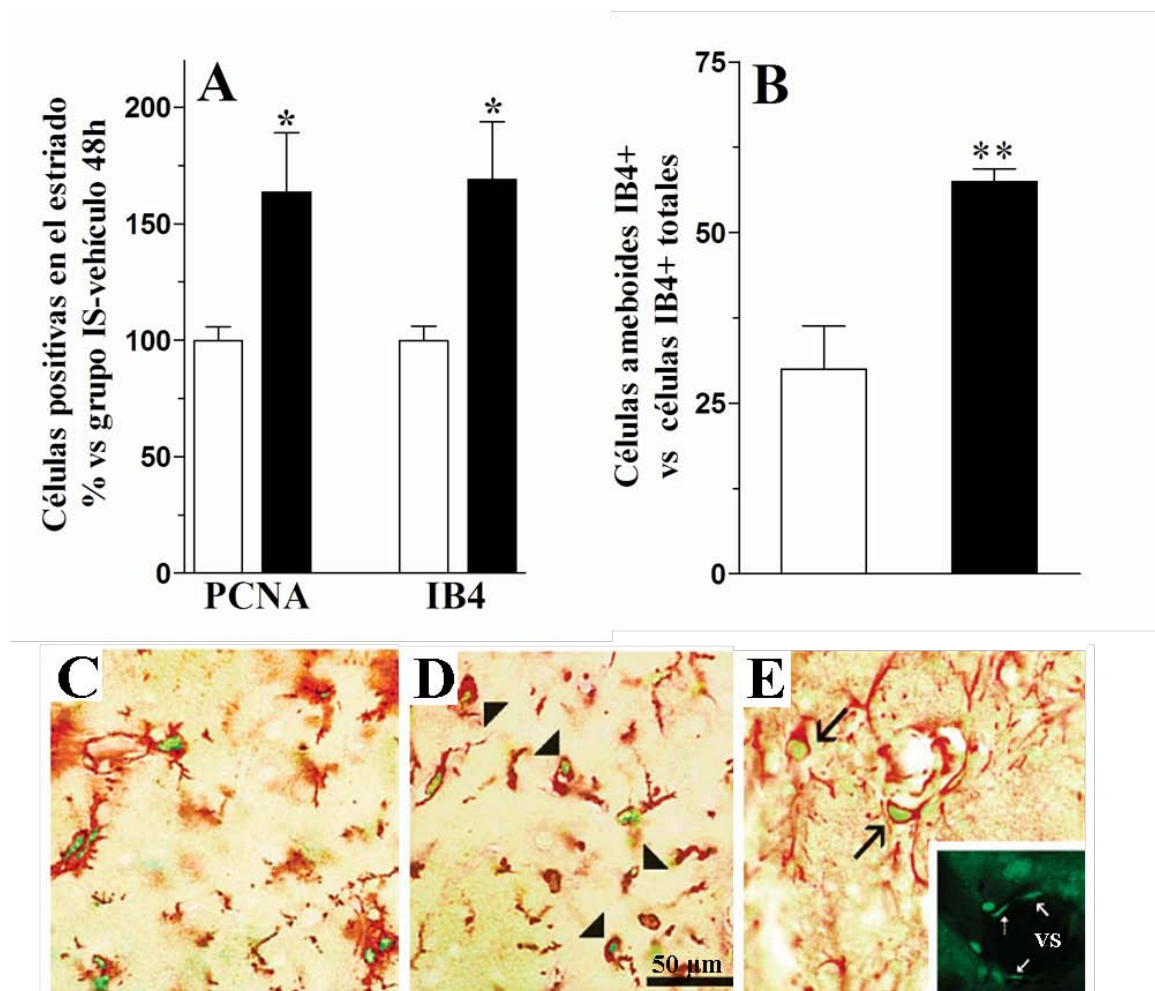


Figura 21. La infusión IS de LGF promueve la proliferación y la activación de la microglía en el estriado de las ratas lesionadas 6-OHDA. La infusión IS de LGF durante 48H (barras negras) aumentó significativamente el porcentaje de células PCNA+ comparado con la infusión de vehículo durante 48 horas (barras blancas) (A). El grupo IS-LGF 48H mostró un incremento significativo del porcentaje de células IB4+ (A) y de la proporción de células IB4+ con morfología ameboide (B y puntas de flecha negras en D). En las regiones centrales y ventromediales del estriado del grupo IS-vehículo 48H (C) y del grupo IS-LGF 48H (D) se encontraron muchas células PCNA+ (en verde, C y D) que comarcaron para IB4 (en marrón, C y D). En ambos grupos se hallaron, alrededor de la zona de infusión, varias células PCNA+ (E, en verde) que comarcaron para nestina (en marrón, flechas negras en C). Además, se localizaron algunos núcleos PCNA+ en la pared de los vasos sanguíneos con la típica morfología de las células endoteliales. (Inserto en E, flechas blancas) Los resultados representan la media \pm EEM de 5 animales. El grupo IS-vehículo 48H mostró 291 ± 92 células PCNA+ / mm² (n=5) y 240 ± 30 células IB4+ / mm² (n=5) en el estriado ipsilateral a la lesión. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ vs grupo IS-vehículo 48H. VS, Vaso Sanguíneo. Barra de la escala; 50 μ m (C-E).

Resultados

El anticuerpo OX6 reconoce a los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II el cual es un marcador de microglía activada (Rozovsky y cols. 1998). El estudio de los efectos de la administración de LGF durante 24 horas en el estriado lesionado reveló el aumento de la expresión de este marcador de activación microglial OX6, si se compara con lo hallado en el estriado lesionado del grupo IS-Vehículo 24H (Figura 22B).

Además de la microglía, otros tipos celulares también proliferaron alrededor de la zona de infusión en el estriado. Varias células PCNA+ comarcaron con nestina (Figura 21E). Por otro lado, se localizaron células PCNA+, en las paredes de los vasos sanguíneos, con la típica morfología alargada de las células endoteliales (Figura 21E, inserto). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de estas células entre los grupos de animales IS-vehículo 48H e IS-LGF 48H.

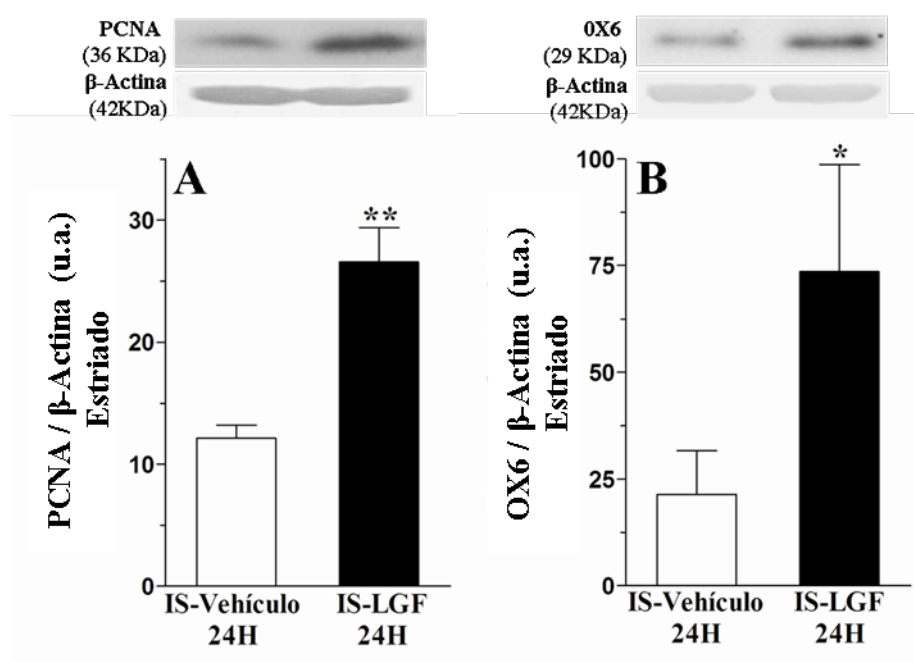


Figura 22. Estudio de los efectos de la administración IS de LGF sobre la proliferación celular y la activación de la microglía en el estriado lesionado con 6-OHDA. Análisis por *Western blot* de la expresión de PCNA (A) y de OX6 (B) en el estriado lesionado de los animales del grupo IS-Vehículo 24H (barras blancas) e IS-LGF 24H (barras negras). Nótese el aumento de la expresión de PCNA y OX6 en el estriado lesionado de los animales del grupo IS-LGF 24H en comparación con lo observado en el estriado lesionado del grupo IS-Vehículo 24H. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 a 6 animales independientes. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ vs grupo IS-Vehículo 24H.

2.4 Efectos de la administración IS de LGF sobre la supervivencia celular.

La muerte celular programada está muy regulada por las proteínas de la familia Bcl. En esta familia de proteínas se hallan miembros con efectos anti-apoptóticos como Bcl-2 y miembros con efectos pro-apoptóticos tales como Bax (Gross y cols. 1999). Los análisis por *Western blot* mostraron que la infusión de LGF, en el estriado lesionado de las ratas hemiparkinsonianas, incrementó significativamente la expresión de Bcl-2 en el grupo IS-LGF 24H; mientras que los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax permanecieron invariables tanto en el grupo IS-LGF 24H como en el grupo IS-Vehículo 24H. De este modo, la ratio Bcl-2/Bax fue significativamente mayor en el estriado lesionado del grupo IS-LGF 24H en comparación con lo hallado en el estriado lesionado del grupo IP-Vehículo 24H (Figura 23). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el LGF podría favorecer la supervivencia celular en el estriado lesionado de los animales hemiparkinsonianos.

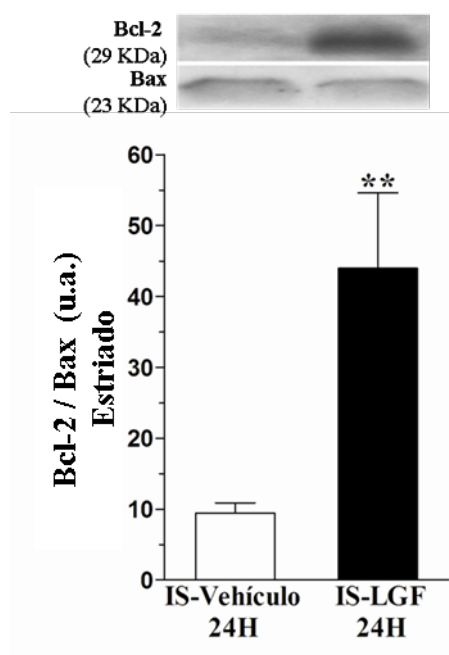


Figura 23. Efectos de la administración IS de LGF sobre la supervivencia celular en el estriado lesionado de ratas hemiparkinsonianas. Análisis por Western blot de la ratio Bcl-2/Bax en el estriado lesionado de los animales del grupo IS-Vehículo 24H (barras blancas) e IS-LGF 24H (barras negras). Nótese el incremento de la ratio Bcl-2/Bax en el estriado lesionado de los animales del grupo IS-LGF 24H en comparación con lo observado en el estriado lesionado del grupo IS-Vehículo 24H. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 a 6 animales independientes. ** $p \leq 0,01$ vs grupo IS-Vehículo 24H.

3. ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE LGF

3.1 Efectos de la administración intraperitoneal de LGF sobre la expresión de tirosina hidroxilasa.

Como ya hemos mostrado anteriormente, la administración intraestriatal de LGF en un modelo experimental de EP estimuló el crecimiento de los terminales dopaminérgicos dañados. Para verificar si hubo actividad neuroregenerativa y/o neuroprotectora ejercida por el tratamiento con LGF intraperitoneal (IP) en los animales con lesiones estriatales parciales por inyección de 6-OHDA, se llevaron a cabo análisis inmunohistoquímicos de secciones coronales del estriado y de la SN.

Los animales lesionados que recibieron 2 inyecciones IP semanales de LGF durante 3 semanas y que fueron sacrificados 4 semanas después del fin del tratamiento (IP-LGF) presentaron un 60% de innervación TH+ en todas las secciones coronales del estriado lesionado analizadas (Figura 24A). Por el contrario, los animales lesionados a los que sólo se les administró vehículo (IP-Vehículo) mostraron únicamente un 35% de innervación TH+ en esta estructura (Figura 24A). Aunque el efecto del LGF sobre la innervación TH+ fue observado en los diferentes niveles del estriado analizados, éste fue mas destacado en las regiones dorsales y centrales de dicha estructura (Figura 26C y 26I). Además, el análisis de los niveles de DA estriatales mostró la capacidad del LGF para incrementar la concentración de este neurotransmisor en el estriado lesionado si se compara con los datos obtenidos para esta misma estructura en los animales IP-Vehículo (Tabla 5).

El estudio histológico de la SNpc reveló la existencia de un reducido número de neuronas TH+ en el lado lesionado de las ratas del grupo IP-Vehículo en comparación con lo hallado en el lado sano (Figura 26D y E) y con lo observado en la SNpc lesionada a las 6 semanas de evolución de la lesión [$14 \pm 1,2$ (n = 11) y $6.5 \pm 1,3$ (n = 8) neuronas TH+/sección a las 6 y 13 semanas post-lesión, respectivamente, $p \leq 0.01$]. El tratamiento con LGF intraperitoneal restauró parcialmente el número de neuronas TH+ en la SNpc del lado lesionado en comparación con lo observado en la SNpc lesionada del grupo IP-Vehículo (Figuras 24B y 26F).

El análisis mediante *Western blot* mostró un aumento significativo en la expresión de la proteína TH en el estriado lesionado de los animales que fueron tratados con LGF durante 3 semanas (grupo IP-LGF) en comparación con los animales IP-vehículo (Figura 25A). Este efecto observado en el estriado no fue hallado en el mesencéfalo lesionado donde la expresión de TH se redujo un 80% tanto el grupo IP-Vehículo como en el grupo IP-LGF (dato no mostrado).

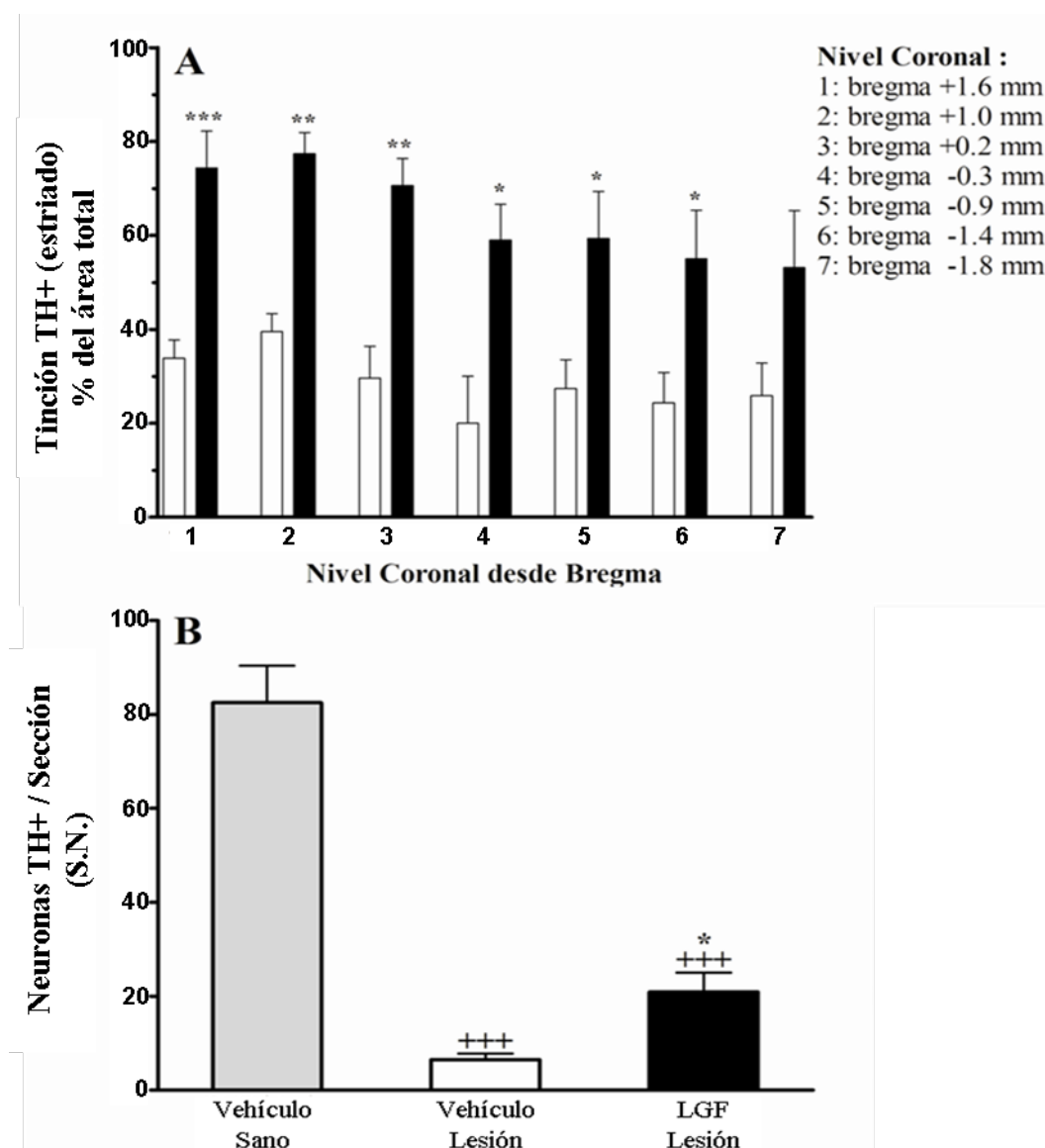


Figura 24. Efecto de la administración de LGF sobre la expresión de TH. Animales hemiparkinsonianos de 6 semanas de evolución recibieron dos inyecciones IP semanales de salino (IP-Vehículo) o de 5 μ g de LGF (IP-LGF) durante 3 semanas, sacrificándose a las 4 semanas post-tratamiento. En A se muestra en distintos niveles coronales el porcentaje del área total del estriado lesionado con invasión TH+ en animales del grupo IP-Vehículo (barras blancas) y en animales del grupo IP-LGF (barras negras). En B se muestra el número de neuronas TH+ / sección que se hallaron en la SNpc sana del grupo IP-Vehículo (barra gris) y en la SNpc lesionada tanto del grupo IP-Vehículo (barra blanca) como del grupo IP-LGF (barra negra). Los resultados representan la media \pm EEM de 4 a 11 animales independientes. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$ vs grupo IP-vehículo lesionado. +++ $p \leq 0,001$ vs grupo IP-vehículo Sano.

	IP-Vehículo Sano	IP-Vehículo Lesionado	IP-LGF Lesionado
Dopamina (ng DA / mg proteína)	56,3±14.3	2.9±0.6 ⁺⁺	4.9±0.4 ^{++,*}

Tabla 5. Efecto de la administración de LGF sobre los niveles de dopamina estriales de los animales hemiparkinsonianos. Nótese el incremento de los niveles de DA en el estriado lesionado de los animales tratados con LGF en comparación con lo hallado en los animales Vehículo. Hay que destacar la gran reducción en los niveles de dopamina ejercida por la lesión con 6-OHDA. Los resultados representan la media \pm EEM de 4 a 7 animales independientes. * $p \leq 0,05$ vs grupo IP-Vehículo Lesionado. ⁺⁺ $p \leq 0,01$ vs grupo IP-Vehículo Sano.

La generación de nuevas neuronas dopaminérgicas pudo contribuir al aumento observado de la innervación dopaminérgica y del número de neuronas TH+. El doble inmunomarcaje no reveló la presencia de células TH+/BrdU+ ni en el estriado sano ni en el lesionado de los animales de los grupos IP-Vehículo e IP-LGF. Además, ninguna de las neuronas TH+ halladas en la SNpc presentaron núcleos BrdU+ (dato no mostrado). Estos resultados sugieren que la administración IP de LGF carece de la capacidad para generar nuevas neuronas del fenotipo catecolaminérgico en las ratas lesionadas con 6-OHDA.

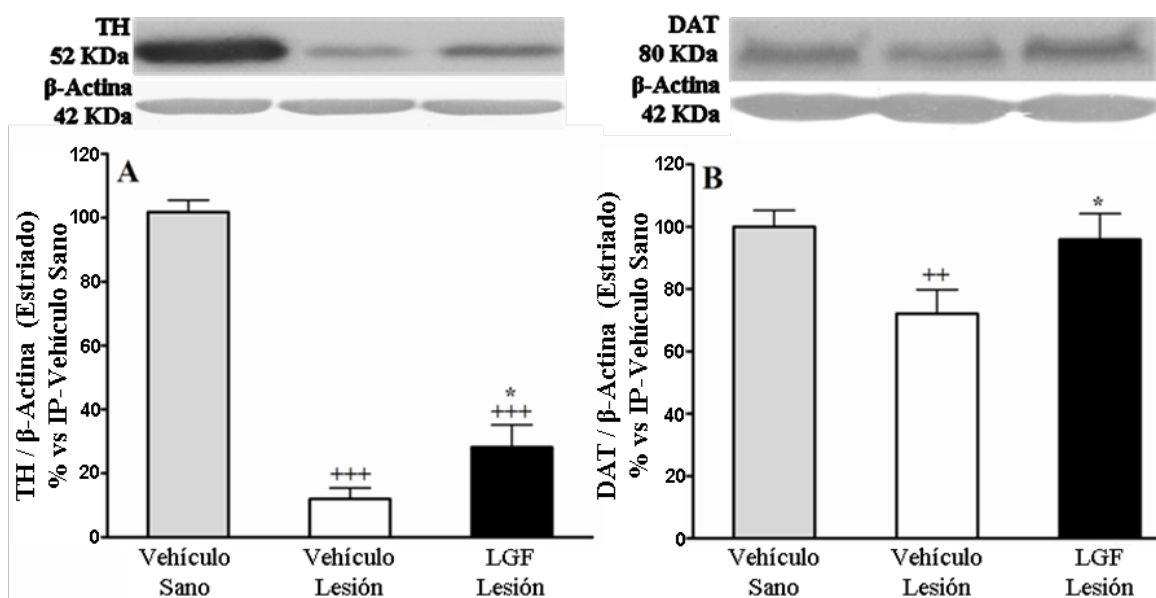


Figura 25. Expresión de TH y DAT en el estriado de animales hemiparkinsonianos tratados con LGF. Análisis por Western blot de la expresión de TH (A) y de DAT (B) en el estriado sano de animales del grupo IP-Vehículo (barras grises) y en el estriado lesionado del grupo IP-Vehículo (barras blancas) y del grupo IP-LGF (barras negras). Nótese el aumento de la expresión de TH y de DAT en el estriado lesionado de los animales tratados con LGF en comparación con lo observado en el estriado lesionado del grupo vehículo. Los resultados representan la media \pm EEM de 6 a 17 animales independientes. * $p \leq 0,05$ vs grupo IP-vehículo lesionado. ⁺⁺ $p \leq 0,01$ y ⁺⁺⁺ $p \leq 0,001$ vs grupo IP-vehículo Sano.

3.2 El tratamiento con LGF IP estimula la expresión de DAT en el estriado lesionado de ratas hemiparkinsonianas.

El transportador de dopamina (DAT), otro marcador del sistema dopaminérgico, fue analizado en el estriado y el mesencéfalo de ratas lesionadas con 6-OHDA. Como se muestra en la figura 25B, la expresión de DAT, estudiada mediante *Western blot*, fue significativamente menor en el estriado lesionado de las ratas del grupo IP-Vehículo en comparación con el lado sano contralateral de la estructura. El tratamiento con LGF durante 3 semanas (IP-LGF) restauró la expresión de DAT a los niveles observados en el estriado sano contralateral a la lesión (Figura 25B).

El análisis inmunohistoquímico de DAT aportó resultados similares a los obtenidos mediante *Western-blot*. La inmunotinción frente a DAT reveló que la expresión de este transportador fue menor en el estriado lesionado de los animales del grupo IP-Vehículo en comparación con el estriado sano contralateral (Figura 26G y H). Los animales del grupo IP-LGF mostraron una mayor inmunorreactividad frente a DAT en el estriado lesionado en comparación con el grupo IP-Vehículo (Figura 26I). Además, la inmunotinción frente a DAT en el estriado sano y lesionado de los animales del grupo IP-Vehículo fue localizada en pequeños puntos distribuidos en el parénquima estriatal, que parecieron corresponder con cuerpos celulares neuronales (Figura 26G y H). Sin embargo, en el estriado lesionado del grupo IP-LGF, la inmunorreactividad frente a DAT se distribuyó en los terminales TH+ en crecimiento y en los cuerpos celulares neuronales (26I)

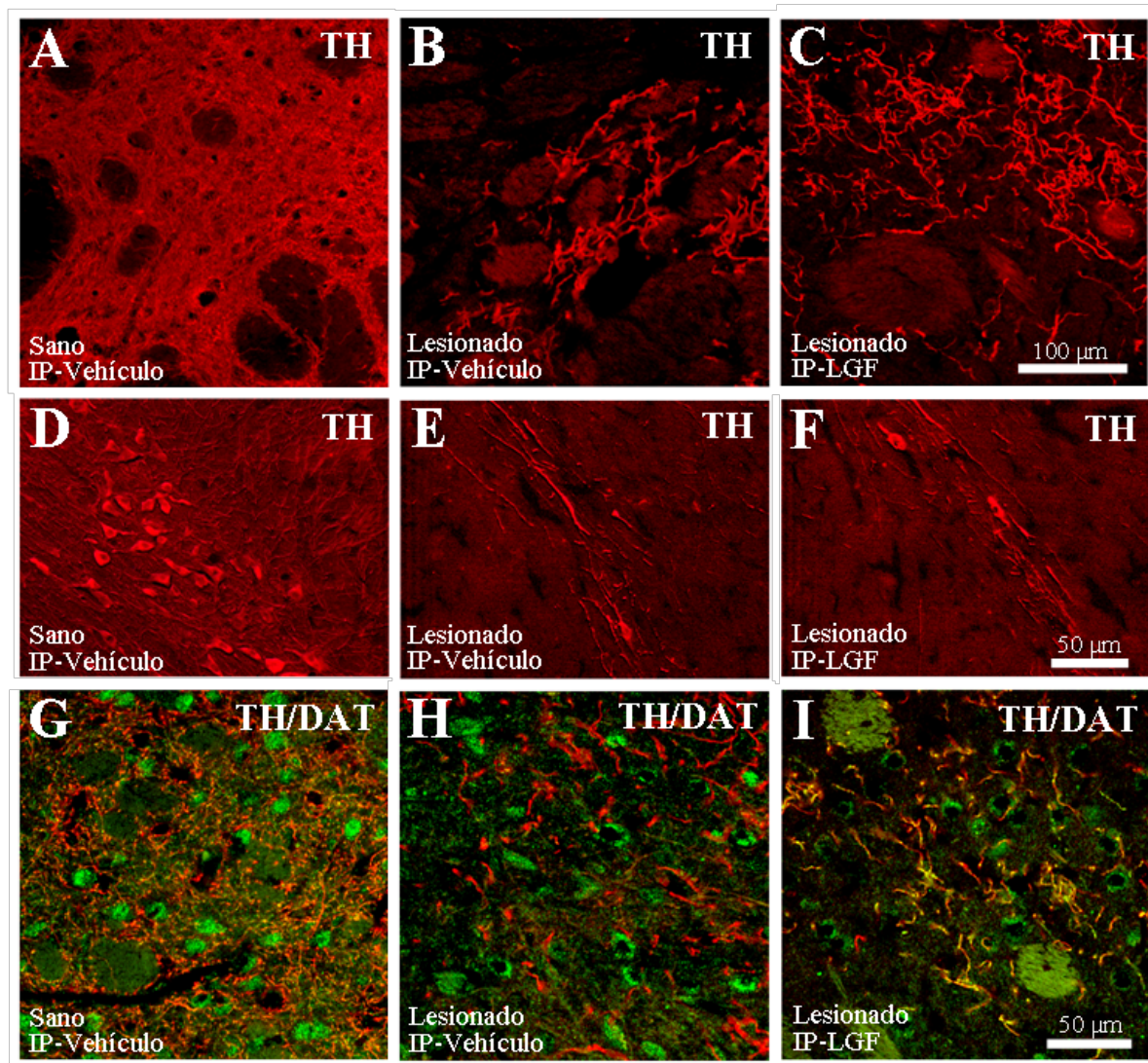


Figura 26. Estudio de la expresión y de la distribución de TH y DAT en el estriado y la SNpc de animales hemiparkinsonianos tratados con LGF. Inmunofluorescencia frente a TH (rojo) en el estriado sano (A) y lesionado (B) del grupo IP-Vehículo y en el estriado lesionado (C) del grupo IP-LGF. Las tres microfotografías centrales (D-F) muestran la inmunotinción frente a TH en la SNpc sana (D) y lesionada (E) del grupo IP-Vehículo y en la SNpc lesionada del grupo IP-LGF (F). Nótese el ligero aumento del número de células TH+ en la SNpc lesionada del grupo IP-LGF (F) en comparación con la SNpc lesionada del grupo IP-Vehículo (E). Los paneles inferiores muestran la doble inmunotinción frente a TH y DAT en el estriado sano (G) y lesionado (H) del grupo IP-Vehículo y en el estriado lesionado (I) del grupo IP-LGF. La administración IP de LGF aumentó la innervación TH+ (C) y la inmunorreactividad frente a DAT (I) en el estriado lesionado en comparación con el grupo IP-Vehículo (B y H). La inmunotinción frente a DAT en el estriado lesionado del grupo IP-LGF fue localizada en los terminales TH+ (I). Barra de la escala; 100 μ m (A-C), 50 μ m (D-F) y 50 μ m (G-I).

3.3 La administración IP de LGF mejora la conducta rotacional y la coordinación motora de los animales hemiparkinsonianos.

Para determinar si la administración intraperitoneal de LGF era capaz de restaurar la función motora de los animales lesionados con 6-OHDA, se llevó a cabo la evaluación semanal de las rotaciones inducidas por apomorfina antes, durante y después del período de tratamiento. Los animales del grupo IP-LGF mostraron una significativa mejoría en el comportamiento rotacional inducido por apomorfina en comparación con los animales pertenecientes al grupo IP-Vehículo (Figura 27A). Debido a que esta mejoría de la conducta rotacional se mantuvo al menos durante 3 semanas adicionales (Figura 27A), estos resultados indicaron que el tratamiento con LGF IP mejoró la función motora de las ratas hemiparkinsonianas.

Los efectos del tratamiento con LGF IP sobre la coordinación motora fueron estudiados mediante el test de aceleración usando un Rota Rod. Como se muestra en la figura 27B, las ratas con lesiones parciales estriatales por inyección de 6-OHDA pertenecientes al grupo IP-Vehículo mostraron un descenso progresivo en su coordinación motora alcanzando la fase de meseta a las 10 semanas post-lesión. Una vez iniciado el tratamiento, este efecto no fue observado en el grupo de animales IP-LGF. De este modo, la coordinación motora en este grupo experimental no empeoró durante los diferentes tiempos post-tratamiento analizados sino que mejoró significativamente en comparación con los animales del grupo IP-Vehículo (Figura 27B).

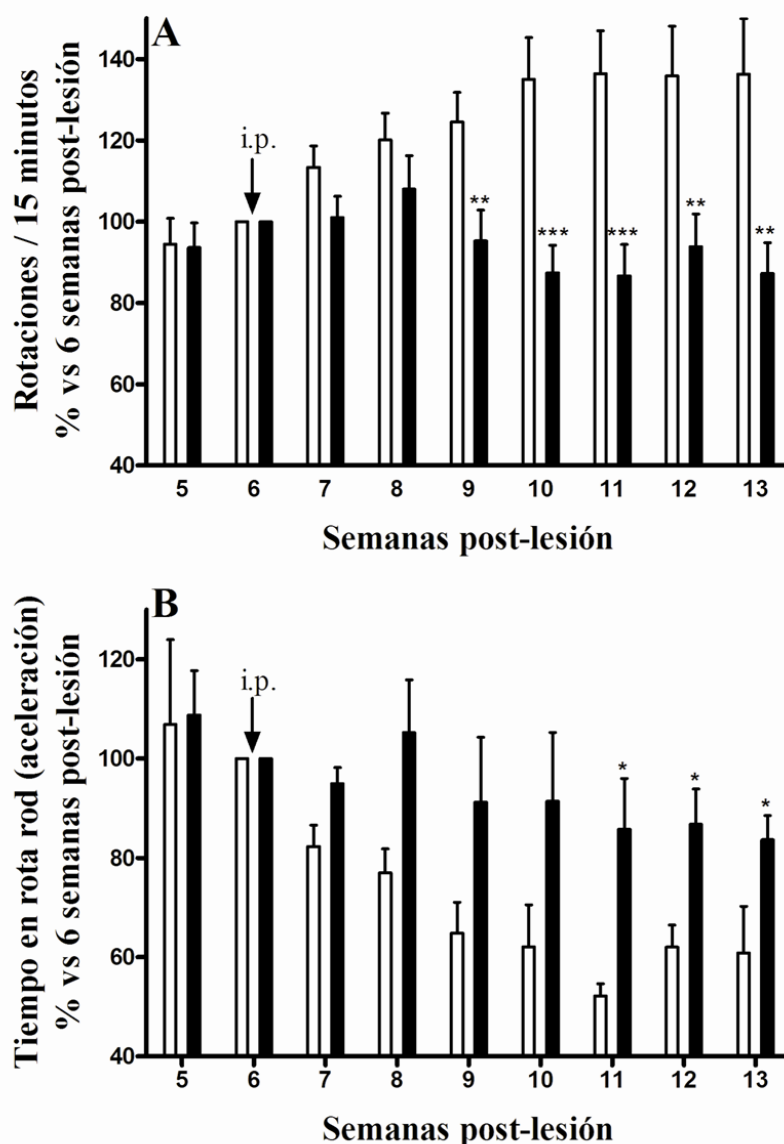


Figura 27. Efectos de la administración de LGF sobre la conducta rotacional y la coordinación motora. Estudio de la conducta rotacional inducida por apomorfina (A) y de la coordinación motora mediante el test de aceleración usando un Rota Rod (B) en el grupo de animales IP-LGF (barras negras) y en el grupo IP-vehículo (barras blancas). Nótese como el tratamiento con LGF disminuyó la conducta rotacional inducida por apomorfina (A) y mejoró la coordinación motora (B) de las ratas hemiparkinsonianas. El número de rotaciones durante 15 minutos a las 6 semanas post-lesión fue de 183 ± 9 ($n=47$). La latencia de caída en el Rota rod a las 6 semanas post-lesión fue de 17 ± 2 segundos ($n=8$). En A, los resultados representan la media \pm EEM de 24 animales IP-vehículo y 23 IP-LGF. En B, los resultados representan la media \pm EEM de 4 animales IP-vehículo y 4 IP-LGF. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,005$ vs grupo IP-vehículo. Inicio de la administración intraperitoneal de vehículo ó LGF (↓).

3.4 El factor de crecimiento de hígado activa a las células gliales y estimula la expresión de TNF- α en las ratas hemiparkinsonianas.

3.4.1 Efectos del LGF sobre la activación de la glía en el estriado y en el mesencéfalo lesionados.

Los resultados de los apartados de infusión intraestriatal y de infusión intracerebroventricular sugieren que las células gliales podrían mediar en los efectos neuroregenerativos y neurogénicos promovidos por el LGF en ratas lesionadas con 6-OHDA. La proliferación celular, fenómeno que forma parte de la respuesta de activación de las células gliales, fue estudiada mediante el análisis por *Western blot* de la proteína PCNA. La expresión de PCNA incrementó un 60% en el estriado lesionado de las ratas del grupo IP-Vehículo en comparación con el estriado sano contralateral del mismo grupo de animales (Figura 28A). Resultados similares fueron observados en el grupo que recibió LGF durante tres semanas (IP-LGF). Sin embargo, la expresión de PCNA fue significativamente mayor en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 48H en comparación con el estriado lesionado y el estriado sano contralateral del grupo IP-Vehículo (Figura 28A).

Para determinar si la administración IP de LGF podría estimular a la microglía se analizaron varios parámetros relacionados con la activación de este tipo celular. El transportador de glucosa Glut-5 es un marcador de las células microgliales (Payne y cols. 1997). Los niveles de Glut-5 incrementaron significativamente en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 48H (Figura 28B). Además, la expresión del marcador de microglía activada OX6 también fue significativamente mayor en el estriado lesionado de los animales del grupo IP-LGF 48H en comparación con lo observado en el estriado lesionado y en el estriado sano contralateral de los animales del grupo IP-Vehículo (Figura 28C). De manera similar, la inmunorreactividad frente a OX6 fue mayor en el parénquima estriatal lesionado del grupo IP-LGF 48H en comparación con lo hallado en el grupo IP-Vehículo (Figura 29A y 29B). También se llevaron a cabo dobles inmunomarcajes frente a PCNA y OX6 para determinar si la administración intraperitoneal de LGF era capaz de estimular la proliferación de las células gliales. Como se muestra en la figura 29A, en el estriado lesionado de los animales del grupo IP-Vehículo solamente se halló un pequeño número de células PCNA⁺ que a su vez comarcaron con OX6. Sin embargo, los animales del grupo

Resultados

IP-LGF 48H presentaron un 20% de células doblemente marcadas para PCNA y OX6 en el parénquima del estriado lesionado (Figura 29B).

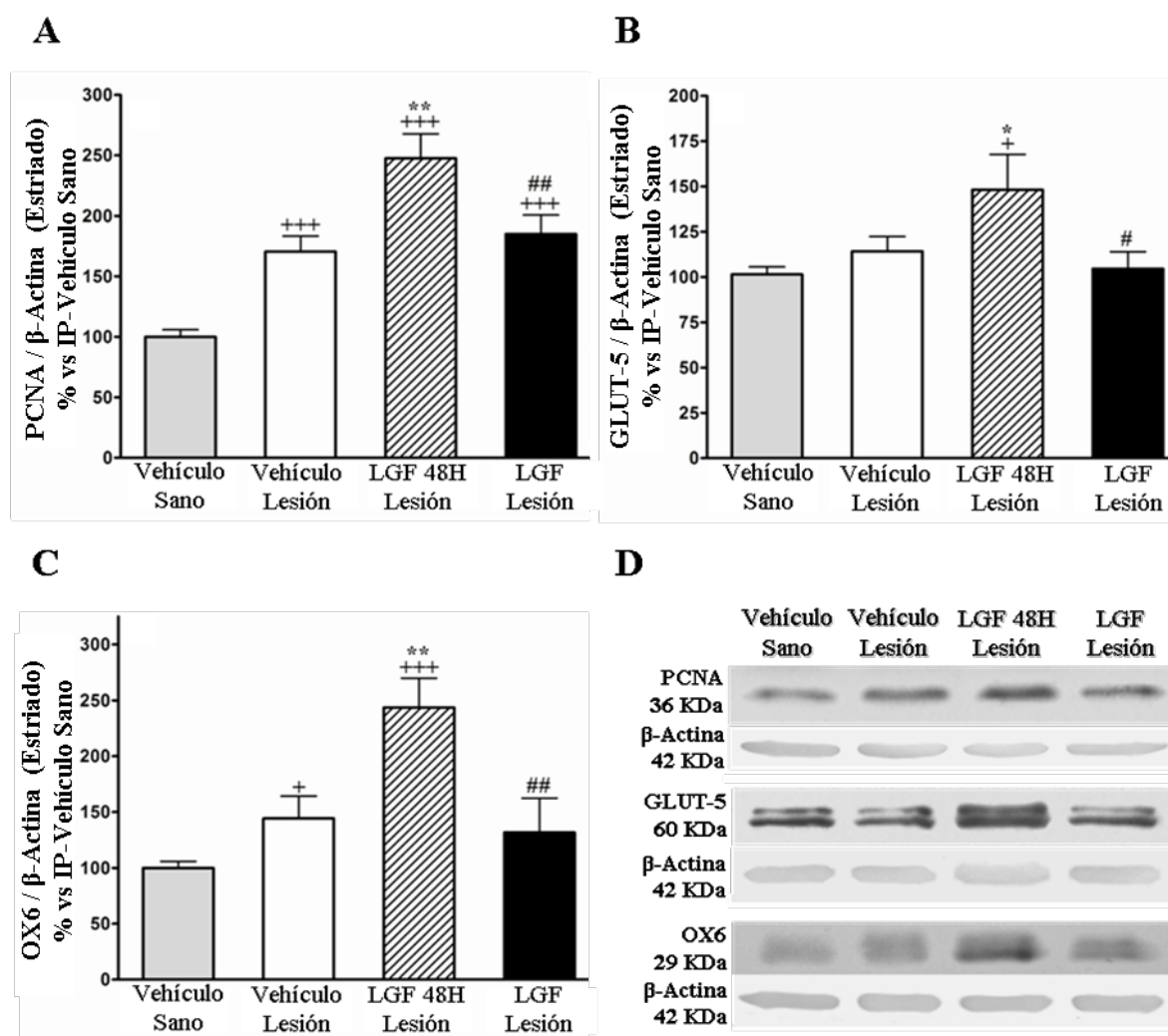


Figura 28. Expresión de PCNA, Glut-5 y OX6 en el estriado de animales hemiparkinsonianos tratados con LGF. Análisis por *Western blot* de la expresión de PCNA (A), Glut-5 (B) y OX6 (C) en el estriado sano de animales del grupo IP-Vehículo (barras grises) y en el estriado lesionado de los grupos: IP-Vehículo (barras blancas), IP-LGF 48H (barras rayadas en diagonal) e IP-LGF (barras negras). En D se muestran los *Western blots* representativos de las gráficas mostradas en A, B y C. Nótese el aumento de la expresión de PCNA, Glut-5 y OX6 en el estriado lesionado de los animales del grupo IP-LGF 48H en comparación con lo observado en el estriado lesionado del grupo vehículo. Además, la administración crónica de LGF (IP-LGF) restauró la expresión de OX6 a niveles similares a los del estriado sano del grupo IP-Vehículo (B). Los resultados representan la media \pm EEM de 7 a 18 animales independientes. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ vs grupo IP-vehículo lesionado. + $p \leq 0,05$ y +++ $p \leq 0,001$ vs grupo IP-vehículo Sano. # $p \leq 0,05$ y ## $p \leq 0,01$ vs grupo IP-LGF 48H.

Por otro lado, la administración de LGF durante 3 semanas (grupo IP-LGF) no afectó a la expresión de Glut-5 y OX6 en el estriado lesionado comparado con los niveles de estas proteínas hallados en el estriado sano y lesionado del grupo IP-Vehículo (Figuras

28B y 28C, respectivamente). Estos resultados sugieren que la activación de la microglía estriatal es un evento temprano en la acción del LGF en las ratas lesionadas con 6-OHDA. Además, el tratamiento con LGF intraperitoneal tampoco afectó, en ninguno de los tiempos post-tratamiento estudiados, a la expresión de las proteínas PCNA, Glut-5 en el mesencéfalo lesionado de las ratas hemiparkinsonianas. Por otro lado, la expresión de OX6 en el mesencéfalo lesionado incrementó, al igual que en el estriado, en el grupo IP-LGF 48H ($153 \pm 16,79$; $N=7$) con respecto al resto de grupos ($p \leq 0,05$) y se redujo en un 61% en los animales IP-LGF ($43,8 \pm 9,5$; $N=7$) en comparación con el grupo IP-Vehículo ($105 \pm 15,8$; $N=14$) ($p \leq 0,05$), sugiriendo un posible papel anti-inflamatorio a largo plazo del LGF en la SN dañada.

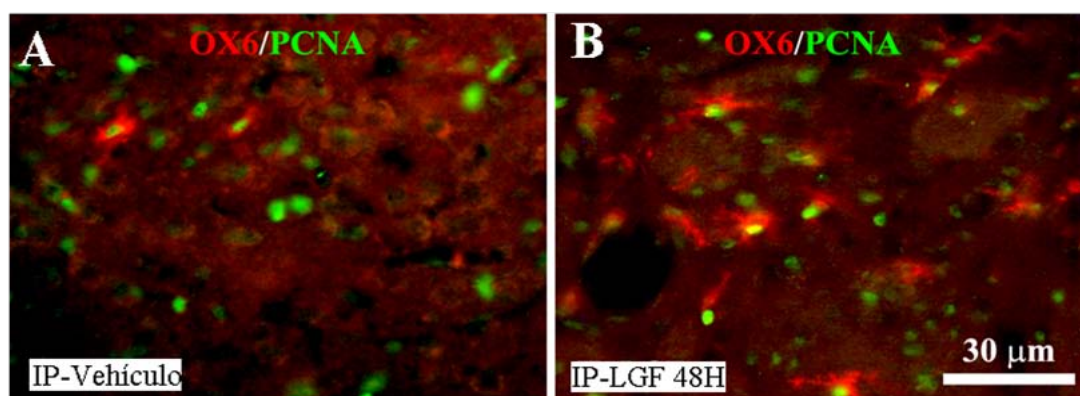


Figura 29. Efectos de la administración de LGF sobre la activación y la proliferación de la microglía. Inmunofluorescencias frente a OX6 (rojo) y PCNA (verde) en el estriado lesionado del grupo IP-Vehículo (A) y en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 48H (B). Nótese la existencia de un mayor número de células microgliales OX6+/PCNA+ en el grupo IP-LGF 48H (C). Barra de la escala; 30 μ m (A y B).

Debido a que los resultados previos de administración ICV mostraron la capacidad del LGF a la hora de estimular a la astrogliá, procedimos a evaluar los efectos de la administración intraperitoneal de este factor en este fenotipo glial. El aumento de la expresión de la proteína GFAP por parte de los astrocitos es una característica de la reactividad glial. La expresión de esta proteína en el estriado lesionado de los animales del grupo IP-Vehículo incrementó en un 70% en comparación con el estriado sano contralateral (Figura 30). Los animales que recibieron una única inyección de LGF y que fueron sacrificados a las 48 horas (IP-LGF 48H) mostraron una mayor expresión de GFAP en el estriado lesionado en comparación con lo hallado en el grupo IP-Vehículo (Figura 30). Sin embargo, la expresión de la proteína GFAP en el estriado lesionado del grupo tratado a largo plazo con LGF (IP-LGF) disminuyó hasta alcanzar niveles similares a los observados en el estriado sano contralateral del grupo IP-Vehículo (Figura 30).

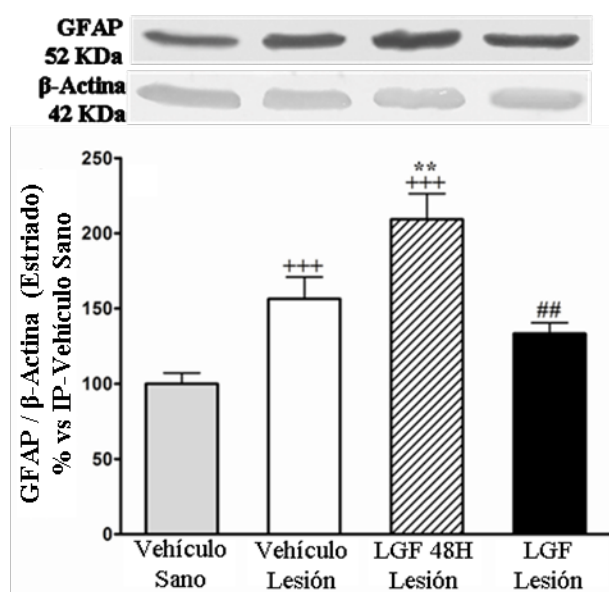


Figura 30. Expresión de GFAP en el estriado de animales hemiparkinsonianos tratados con LGF. Análisis por *Western blot* de la expresión de GFAP en el estriado sano del grupo IP-Vehículo (barras grises) y en el estriado lesionado de los grupos: IP-Vehículo (barras blancas), IP-LGF 48H (barras rayadas en diagonal) e IP-LGF (barras negras). Nótese la mayor expresión de GFAP en el grupo IP-LGF 48H en comparación con lo observado en el estriado lesionado del grupo vehículo. Los resultados representan la media \pm EEM de 7 a 18 animales independientes. *** $p \leq 0,01$ vs grupo IP-vehículo lesionado. +++ $p \leq 0,001$ vs grupo IP-vehículo Sano. ## $p \leq 0,01$ vs grupo IP-LGF 48H.

El estudio inmunohistoquímico reveló que el tratamiento con LGF no afectó a la proliferación de los astrocitos ya que se observaron pocas células PCNA+/GFAP+ en el estriado lesionado tanto en el grupo IP-Vehículo (Figura 31A) como en el grupo IP-LGF 48H (Figura 31B). No obstante, las células GFAP+ halladas en el estriado lesionado de las ratas del grupo IP-LGF 48H (Figura 31B) mostraron hipertrofia del cuerpo celular en comparación con lo observado en el grupo IP-Vehículo (Figura 31A).

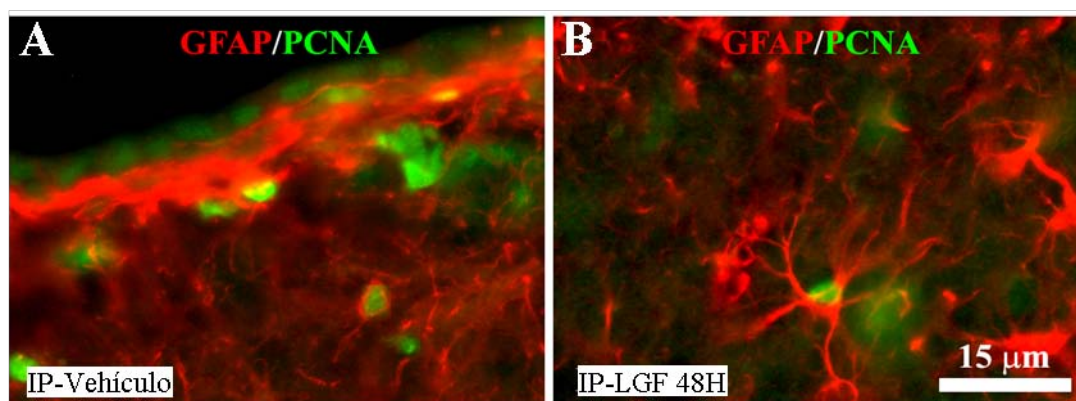


Figura 31. Efectos de la administración de LGF sobre la astrogliá. Inmunofluorescencias frente a GFAP (rojo) y PCNA (verde) en el estriado lesionado del grupo IP-Vehículo (A) y en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 48H (B). Nótese la presencia de astrocitos GFAP+ con hipertrofia del cuerpo celular (B) en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 48H. Sin embargo, se observaron pocas células PCNA+/GFAP+ en el estriado lesionado de ambos grupos. Barra de la escala; 15 μ m (A y B).

Por otro lado, el análisis de la expresión de GFAP en el mesencéfalo lesionado de las ratas hemiparkinsonianas reveló que la administración intraperitoneal de LGF no modificó la expresión de esta proteína en ninguno de los tiempos post-tratamiento estudiados (dato no mostrado).

3.4.2 El LGF estimula la expresión de TNF- α en el estriado lesionado con 6-OHDA.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citoquina sintetizada y liberada por la microglía activada (Wang y cols. 2003; Suzuki y cols. 2004), cuya regulación al alza está mediada por la actividad del LGF en el hígado de la rata (Díaz-Gil y cols. 2003). El análisis por *Western blot* reveló que los niveles de TNF- α en el estriado lesionado de las ratas del grupo IP-Vehículo aumentaron en un 25% en comparación con lo hallado en el estriado sano contralateral del mismo grupo de animales (Figura 32D). La expresión de esta citoquina también fue significativamente mayor en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 48H si se compara con los grupos IP-Vehículo Sano e IP-Vehículo lesionado (Figura 32D). Sin embargo, la expresión de TNF- α en el estriado lesionado del grupo que fue tratado con LGF durante 3 semanas (IP-LGF) se redujo a niveles similares a lo hallado en el estriado del grupo IP-Vehículo Sano (Figura 32D). Por otro lado, la administración intraperitoneal de LGF no produjo cambios en la expresión de TNF- α en el mesencéfalo de los animales tratados intraperitonealmente con LGF o vehículo (dato no mostrado).

El análisis de la expresión de TNF- α mediante inmunohistoquímica mostró resultados similares. De este modo, se hallaron un mayor número de células positivas para TNF- α en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 48H si se compara con lo hallado en la misma estructura del grupo IP-Vehículo (Figuras 32A y 32B). Además, en el grupo experimental IP-LGF 48H, las células positivas para TNF- α también lo fueron para OX6 (Figura 32C) y mostraron morfología de célula de microglía (Figura 32B, inserto), hecho que sugiere que el LGF fue capaz de estimular la síntesis de TNF- α en este tipo celular.

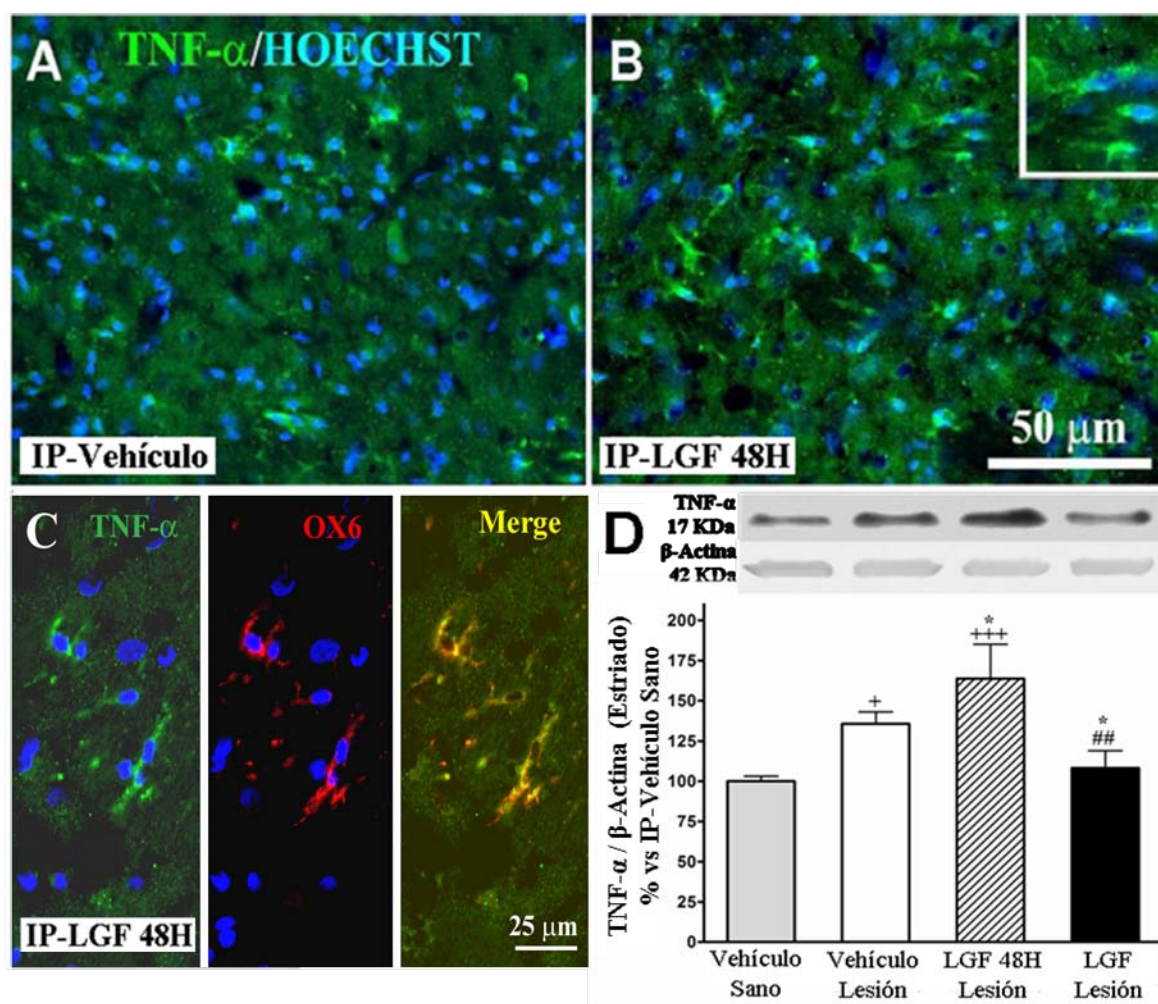


Figura 32. Efectos de la administración de LGF sobre la expresión de TNF- α . Inmunofluorescencias frente a TNF- α (verde) en el estriado lesionado de los grupos IP-Vehículo (A) e IP-LGF 48H (B). Nótese la existencia de un mayor número de células positivas para TNF- α en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 48H (B) y como su morfología fue similar a la de la microglía (B, inserto). Las imágenes en C muestran células inmunopositivas para OX6 (rojo) y TNF- α (verde) en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 48H. En D se muestra la expresión de TNF- α en el estriado sano (barra gris) y lesionado (barra blanca) del grupo IP-vehículo, y en el estriado lesionado de los grupos IP-LGF 48H (barra rayada en diagonal) y del grupo IP-LGF (barra negra). Nótese como la lesión con 6-OHDA incrementó la expresión de TNF- α , y como el tratamiento durante 3 semanas con LGF redujo la expresión de esta citoquina a niveles similares a los encontrados en el estriado sano del grupo IP-Vehículo. Los resultados representan la media \pm EEM de 7 a 18 animales independientes. $\leq 0,05$ vs grupo IP-vehículo lesionado. $^+p \leq 0,05$ y $^{+++}p \leq 0,001$ vs grupo IP-Vehículo Sano. $^{##}p \leq 0,01$ vs grupo IP-LGF 48H. Barra de la escala; 50 μ m (A y B) y 25 μ m (C).

3.4.3 Efectos del LGF sobre la activación de la glía y la expresión de TNF- α en el estriado y el mesencéfalo sanos.

El estudio de los efectos de la administración intraperitoneal de LGF sobre la proliferación celular y la glía en el estriado sano contralateral a la lesión reveló un aumento significativo de la expresión de OX6, TNF- α , PCNA, GFAP y GLUT-5 en el estriado sano del grupo IP-LGF 48H (Figuras 33A, 33B, 34A, 34B, 34C y 34D respectivamente). Sin embargo, este efecto no fue observado en los estriados sanos tanto del grupo IP-Vehículo como del grupo que recibió LGF durante 3 semanas IP-LGF (Figuras 33A, 33B, 34A, 34B, 34C y 34D respectivamente).

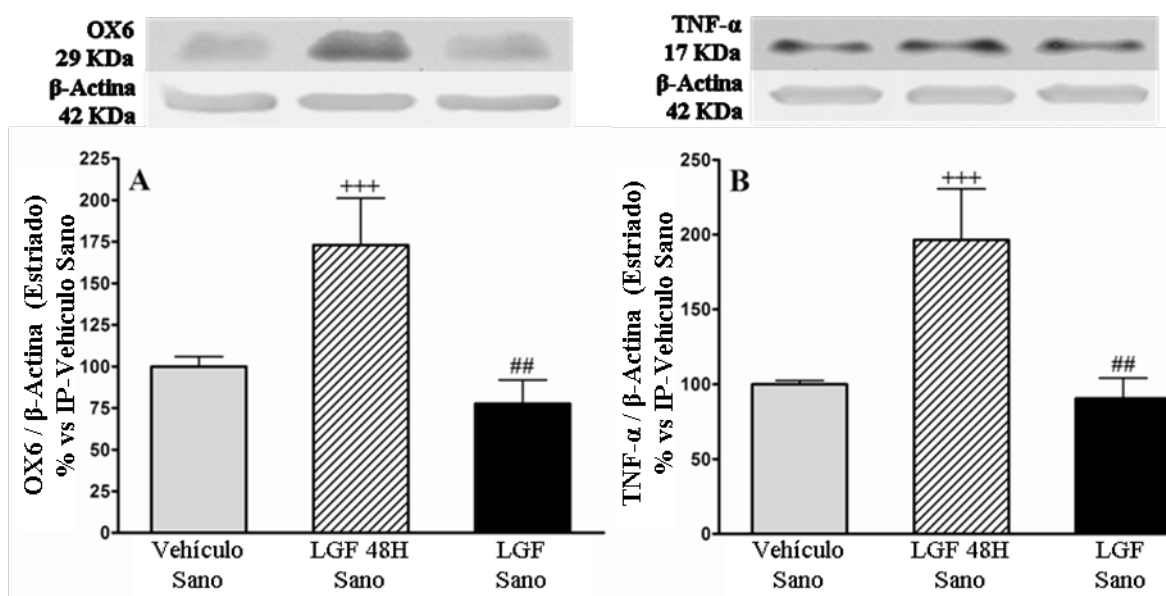


Figura 33. Efectos de la administración de LGF sobre la activación de la microglía y la expresión de TNF- α en el estriado sano de animales lesionados con 6-OHDA. Análisis por *Western blot* de la expresión de OX6 (A) y TNF- α (B) en los estriados sanos de los animales del grupo IP-Vehículo (barras grises), IP-LGF 48H (barras rayadas en diagonal) e IP-LGF (barras negras). Nótese el aumento de la expresión de OX6 en el estriado lesionado de los animales del grupo IP-LGF 48H en comparación con lo observado en el resto de grupos experimentales. En B se muestra como la administración IP de LGF incrementó la expresión de TNF- α en el estriado sano del grupo IP-LGF 48H. Los resultados representan la media \pm EEM de 6 a 16 animales independientes. ⁺⁺⁺ $p \leq 0,001$ vs grupo IP-Vehículo Sano. ^{##} $p \leq 0,01$ vs grupo IP-LGF 48H.

También se llevó a cabo el análisis de la activación de la microglía en los mesencéfalos sanos contralaterales al hemisferio lesionado de los animales hemiparkinsonianos. Los resultados mostraron que la administración intraperitoneal de LGF incrementó la expresión de OX6 en el grupo de animales IP-LGF 48H si se compara

Resultados

con los resultados hallados en los mesencéfalos sanos de los grupos IP-Vehículo e IP-LGF (Figura 35).

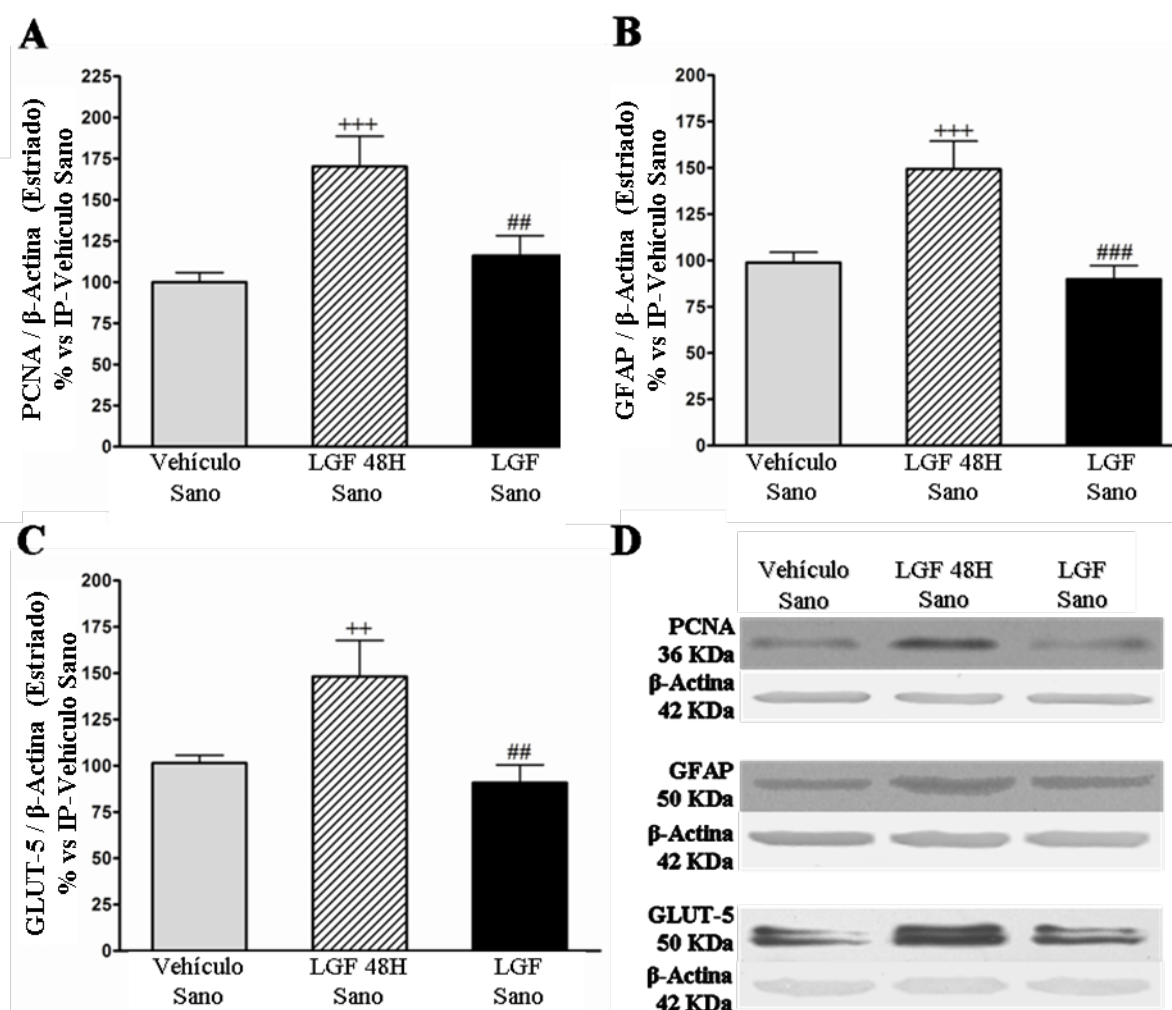


Figura 34. Expresión de PCNA, GFAP y Glut-5 en el estriado sano de animales hemiparkinsonianos tratados con LGF. Análisis por *Western blot* de la expresión de PCNA (A), GFAP (B) y GLUT-5 (C) en el estriado sano de los animales del grupo IP-Vehículo (barras grises), IP-LGF 48H (barras rayadas en diagonal) e IP-LGF (barras negras). En D se muestran los *Western blots* representativos de las gráficas mostradas en A, B y C. Nótese el aumento de la expresión de PCNA, GFAP y GLUT-5 en el estriado sano de los animales del grupo IP-LGF 48H en comparación con lo observado en el estriado sano de los grupo IP-Vehículo e IP-LGF. Los resultados representan la media \pm EEM de 7 a 18 animales independientes. ⁺⁺ $p \leq 0,01$ ⁺⁺⁺ $p \leq 0,001$ vs grupo IP-vehículo Sano. ^{##} $p \leq 0,01$ y ^{###} $p \leq 0,001$ vs grupo IP-LGF 48H.

Por último, el análisis de la expresión de $\text{TNF-}\alpha$, del marcador de proliferación celular (PCNA) y de los marcadores gliales GFAP y GLUT-5 en el mesencéfalo sano de los animales lesionados con 6-OHDA, mostró que el tratamiento con LGF intraperitoneal no produjo cambios significativos en ninguno de los tiempos post-tratamiento estudiados (datos no mostrados).

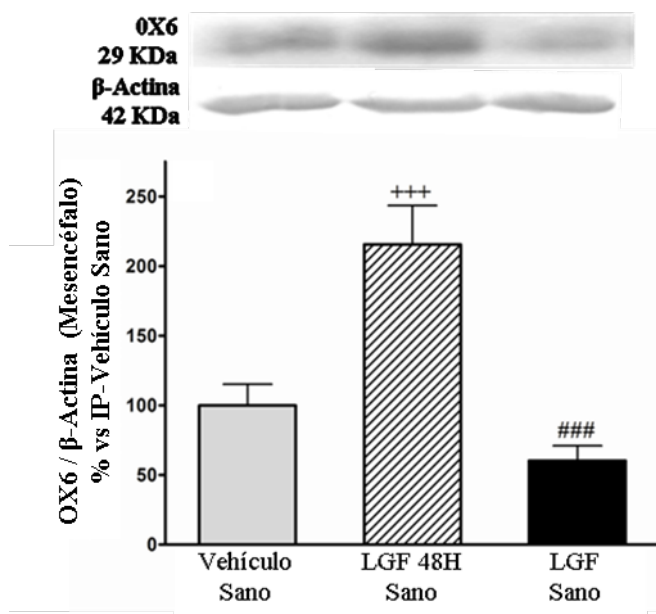


Figura 35. Efectos de la administración de LGF sobre la activación microglial en el mesencéfalo sano. Análisis por Western blot de la expresión de OX6 en el mesencéfalo sano de los animales de los grupos IP-Vehículo (barra gris), IP-LGF 48H (barra rayada en diagonal) e IP-LGF (barra negra). Nótese el aumento de la expresión de OX6 en el estriado lesionado de los animales del grupo IP-LGF 48H en comparación con lo observado en el resto de los grupos experimentales. Los resultados representan la media \pm EEM de 7 a 11 animales independientes. +++p \leq 0,001 IP-Vehículo Sano y ###p \leq 0,001 vs grupo IP-LGF.

3.5 Activación de la vía de señalización de MAPK/ERK1/2 y efectos sobre la fosforilación de CREB mediante el tratamiento con LGF.

La ruta de transducción de señal mediada por MAPK/ERK regula varios procesos celulares incluyendo la proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular (Frebel y Wiese, 2006). Para determinar si esta ruta de señalización fue activada por la acción del LGF, se llevó a cabo el análisis mediante *Western blot* del estriado y del mesencéfalo de ratas lesionadas con 6-OHDA que previamente habían sido tratadas con una única dosis de LGF IP o vehículo.

La lesión con 6-OHDA no afectó a los niveles de expresión de fosfo-ERK1/2 (P-ERK1/2) y de ERK1/2 en el estriado. Sin embargo, veinticuatro horas después de la administración IP de LGF (grupo IP-LGF 24H), la expresión en el estriado lesionado de P-ERK1 y P-ERK2 incrementó en un 270% y en un 160%, respectivamente, en comparación con lo observado en el estriado lesionado del grupo IP-Vehículo. Dado que el tratamiento con LGF no modificó los niveles de ERK1/2, las ratios P-ERK1/ERK1 (Figura 36A) y P-ERK2/ERK2 (Figura 36B) también aumentaron significativamente en el estriado lesionado de los animales IP-LGF 24H. El análisis inmunohistoquímico de P-ERK1/2 confirmó estos resultados ya que el estriado lesionado del grupo IP-LGF 24H mostró mayor

Resultados

inmunorreactividad para P-ERK1/2 que el estriado lesionado de los animales del grupo IP-Vehículo (Figuras 36C y D).

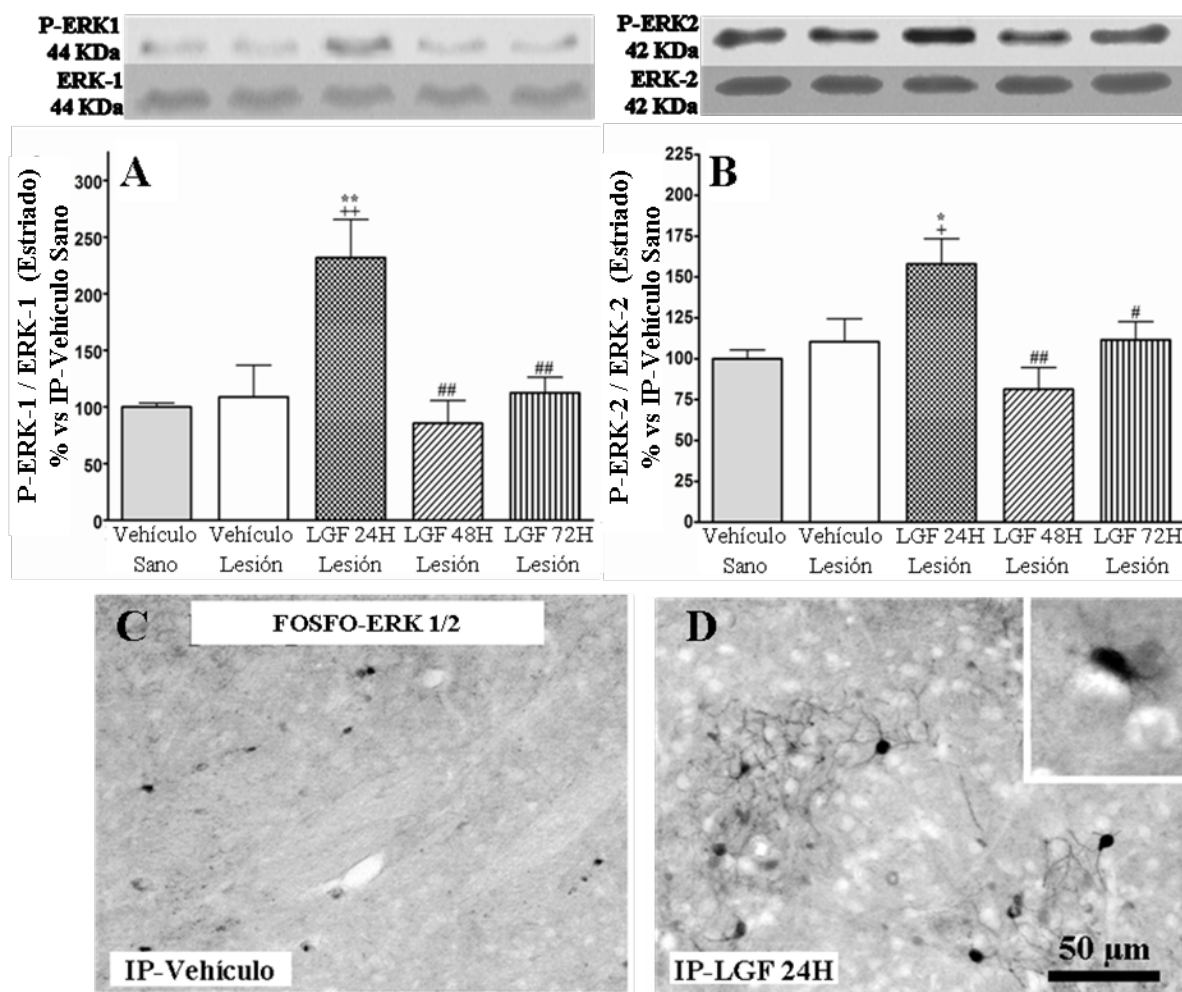


Figura 36. Efectos de la administración de LGF sobre la fosforilación de ERK1/2 en el estriado. En A y B se muestra la relación P-ERK1/ERK1 (A) y P-ERK2/ERK2 (B) en el estriado sano de animales del grupo IP-Vehículo (barras grises) y en el estriado lesionado de los grupos: IP-Vehículo (barras blancas), IP-LGF 24H (barras punteadas), IP-LGF 48H (barras rayadas en diagonal) e IP-LGF 72H (barras rayadas en vertical). Nótese como en el grupo IP-LGF 24H las ratios P-ERK1/ERK1 (A) y P-ERK2/ERK2 (B) aumentaron significativamente en comparación con el resto de grupos estudiados. En C y D se muestra la inmunotinción frente a P-ERK1/2 en el estriado lesionado del grupo IP-Vehículo (C) y en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 24H (D). El grupo IP-LGF 24H (D) mostró mayor marcaje que el grupo IP-Vehículo (C). Nótese como algunas células P-ERK1/2 inmunopositivas mostraron la morfología de glía ramificada en el grupo IP-LGF 24H (Inserto en D). Los resultados representan la media \pm EEM de 6 a 7 animales independientes. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ vs grupo IP-Vehículo lesionado. + $p \leq 0,05$ y ++ $p \leq 0,01$ IP-Vehículo Sano. # $p \leq 0,05$ y ## $p \leq 0,01$ vs grupo IP-LGF 24H. Barra de la escala; 50 μ m.

La proteína de unión a elementos que responden a AMPc (CREB) es un factor de transcripción que requiere de una fosforilación crítica en la Ser133 necesaria para la

activación transcripcional (Beitner-Johnson y cols. 2000). Un amplio rango de neurotransmisores y neuromoduladores, entre los que se incluyen los factores tróficos, convergen en CREB a la hora de regular la supervivencia neuronal mediante la activación de varias rutas de señalización celular como MAPK/ERK (Impey y cols. 1998; Roberson y cols. 1999; Sung y cols. 2001; Azadi y cols. 2007). Además, CREB es un importante regulador de la expresión de TH y de la expresión de genes inducida por neurotrofinas (Bonni y cols. 1995; Finkbeiner y cols. 1997; Theofilopoulos y cols. 2001).

Para determinar si CREB podría ser un punto de convergencia en la acción del LGF, se llevaron a cabo análisis de la expresión de fosfo-CREB en el estriado y en el meséncéfalo de animales lesionados con 6-OHDA los cuales fueron tratados mediante inyección intraperitoneal de vehículo ó LGF. Como se muestra en la figura 37A, la expresión de fosfo-CREB incrementó significativamente en el estriado lesionado de las ratas del grupo IP-LGF 72H en comparación con lo hallado en el resto de grupos. Sin embargo, la expresión de fosfo-CREB en el mesencéfalo lesionado no fue afectada por la administración intraperitoneal de LGF en ninguno de los grupos experimentales estudiados (dato no mostrado).

El análisis inmunohistoquímico de fosfo-CREB aportó resultados similares dado que en el parénquima estriatal lesionado del grupo IP-LGF 72H se observó mayor inmunorreactividad frente a fosfo-CREB en comparación con lo hallado en el estriado lesionado del grupo de animales IP-Vehículo (Figuras 37B y C). En cambio, no se hallaron diferencias en el marcaje frente a fosfo-CREB entre las SN lesionadas de los animales de los grupos tratados con vehículo ó LGF (dato no mostrado).

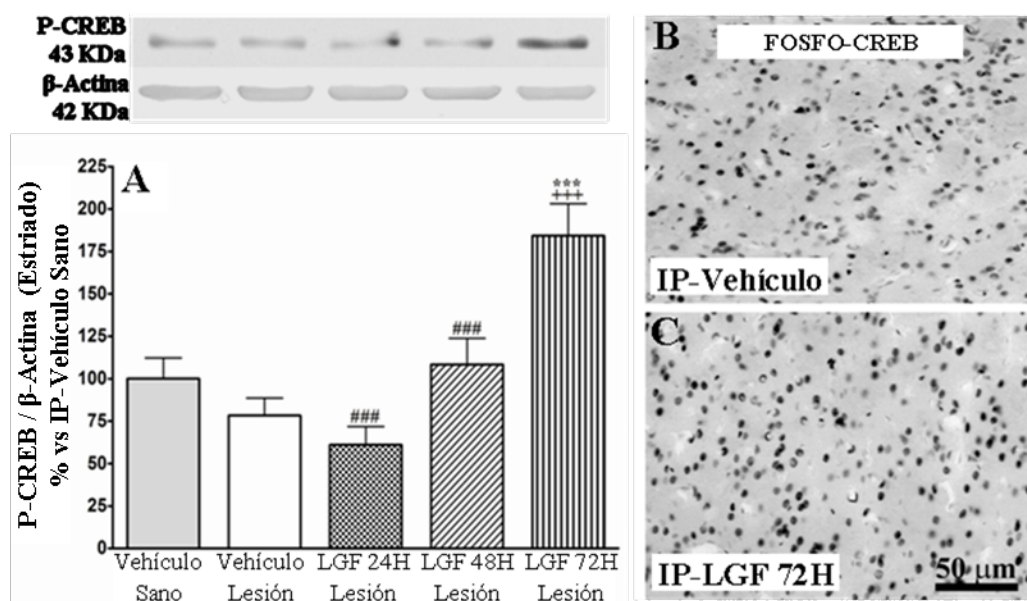


Figura 37. Efectos de la administración de LGF sobre la expresión de fosfo-CREB. Análisis por *Western blot* de la expresión de fosfo-CREB (A) en el estriado sano de animales del grupo IP-Vehículo (barra gris) y en el estriado lesionado de los grupos: IP-Vehículo (barra blanca), IP-LGF 24H (barras punteadas), IP-LGF 48H (barras rayadas en diagonal) e IP-LGF 72H (barras rayadas en vertical). La expresión de fosfo-CREB incrementó en el estriado lesionado de los animales del grupo IP-LGF 72H (A) en comparación con lo observado en el resto de los grupos experimentales. Las dos microfotografías de la parte derecha del panel representan el inmunomarcaje frente a fosfo-CREB en el estriado lesionado del grupo IP-Vehículo (C) y en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 72H (E). Nótese la existencia de un mayor número de células fosfo-CREB+ en el grupo IP-LGF 72H (E) en comparación con el grupo IP-Vehículo (C). Los resultados representan la media \pm EEM de 6 a 8 animales independientes. *** $p \leq 0,001$ vs grupo IP-Vehículo lesionado. +++ $p \leq 0,001$ vs grupo IP-vehículo Sano. ### $p \leq 0,001$ vs grupo IP-LGF 72H. Barra de la escala; 50 μ m (B y C).

Por otro lado, también se llevó a cabo el estudio de los efectos del LGF sobre la activación de ERK y CREB en el estriado sano contralateral a la lesión. Veinticuatro horas después de la administración IP de LGF (grupo IP-LGF 24H), la expresión en el estriado sano de P-ERK1 y P-ERK2 incrementó en un 260% y en un 180%, respectivamente, en comparación con lo observado en el estriado sano del grupo IP-Vehículo. Dado que el tratamiento con LGF no afectó a los niveles de ERK1/2, las ratios P-ERK1/ERK1 (Figura 38A y D) y P-ERK2/ERK2 (Figura 38B y D) también aumentaron significativamente en el estriado sano de los animales IP-LGF 24H. Estos resultados fueron similares a los observados en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 24H. La expresión de fosfo-CREB en el estriado sano de animales lesionados con 6-OHDA incrementó significativamente en el estriado sano de las ratas del grupo IP-LGF 72H en comparación con lo hallado en el resto de grupos (Figura 38C y D).

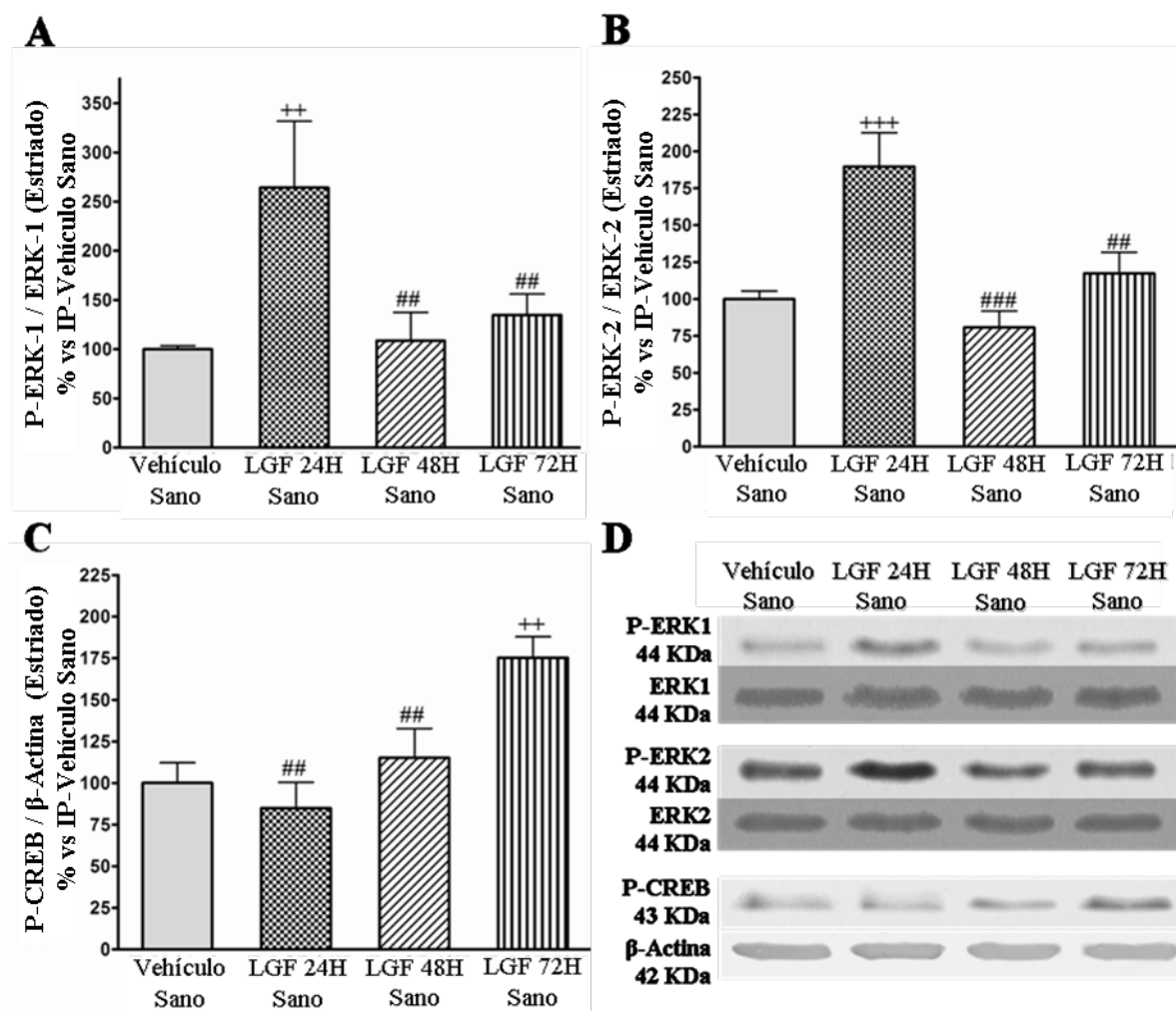


Figura 38. Efectos de la administración de LGF sobre la fosforilación de ERK1/2 y la expresión de fosfo-CREB en el estriado sano. En A y B se muestra la relación fosfo-ERK1/ERK1 (A) y fosfo-ERK2/ERK2 (B) en el estriado sano de los grupos IP-Vehículo (barras grises), IP-LGF 24H (barras punteadas), IP-LGF 48H (barras rayadas en diagonal) e IP-LGF 72H (barras rayadas en vertical). En C se muestra la expresión de fosfo-CREB en los mismos grupos experimentales. Nótese como el tratamiento con LGF incrementó la relación fosfo-ERK1/ERK1 (A) y fosfo-ERK2/ERK2 en el grupo IP-LGF 24H, y la expresión de fosfo-CREB en el grupo experimental IP-LGF 72H. En D se muestran los *Western blots* representativos de las gráficas representadas en A, B y C. Los resultados representan la media \pm EEM de 6 a 8 animales independientes. ⁺⁺ $p \leq 0,01$ y ⁺⁺⁺ $p \leq 0,001$ IP-Vehículo Sano. ^{##} $p \leq 0,01$ vs grupo IP-LGF 24H sano en A y B. ^{##} $p \leq 0,01$ vs grupo IP-LGF 72H sano en C.

El análisis de la fosforilación de ERK y del factor de transcripción CREB en el mesencéfalo sano y lesionado de los animales hemiparkinsonianos, reveló que no se produjo activación de estas rutas de señalización mediante el tratamiento con LGF intraperitoneal en ninguno de los tiempos post-tratamiento estudiados (datos no mostrados).

3.6 Efectos del LGF sobre la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Bcl-2 es una proteína anti-apoptótica cuya expresión puede ser regulada por las vías de señalización mediada por MAPK/ERK (Liu y cols. 1999). La expresión de Bcl-2 incrementó en un $220 \pm 60 \%$ en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 24H con respecto a lo observado en el estriado lesionado del grupo IP-Vehículo, mientras que los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax permanecieron invariables en todos los grupos analizados. De este modo, la ratio Bcl-2/Bax fue significativamente mayor en el estriado lesionado del grupo IP-LGF 24H en comparación con lo hallado en el estriado lesionado del grupo IP-Vehículo (Figura 39A y 39D1).

Tanto la expresión de Bcl-2 como la ratio Bcl-2/Bax incrementaron significativamente en el mesencéfalo lesionado del grupo IP-LGF 48H en comparación con el mesencéfalo lesionado y el mesencéfalo sano del grupo IP-Vehículo (Figura 39B y 39D2). No se observaron cambios significativos en la ratio Bcl-2/Bax ni en el estriado ni en el mesencéfalo lesionados del grupo IP-LGF 72H ya que la expresión de estas proteínas no se vio afectada por el tratamiento con LGF en este tiempo experimental (Figuras 39A, 39B, 39D1 y 39D2).

Tampoco se hallaron cambios en la expresión de Bcl-2 y en la ratio Bcl2/Bax en el estriado sano contralateral a la lesión de todos los grupos experimentales analizados en este estudio (dato no mostrado). Sin embargo, estos parámetros incrementaron significativamente en el mesencéfalo sano del grupo IP-LGF 48H en comparación con lo observado el mesencéfalo sano del grupo IP-Vehículo (Figura 39C y 39D3). Además, no se observaron cambios significativos en la ratio Bcl-2/Bax en el mesencéfalo sano del resto de grupos analizados (Figura 39C y 39D3). Los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax permanecieron invariables en el mesencéfalo sano de todos los grupos estudiados (Figura 39C y 39D3).

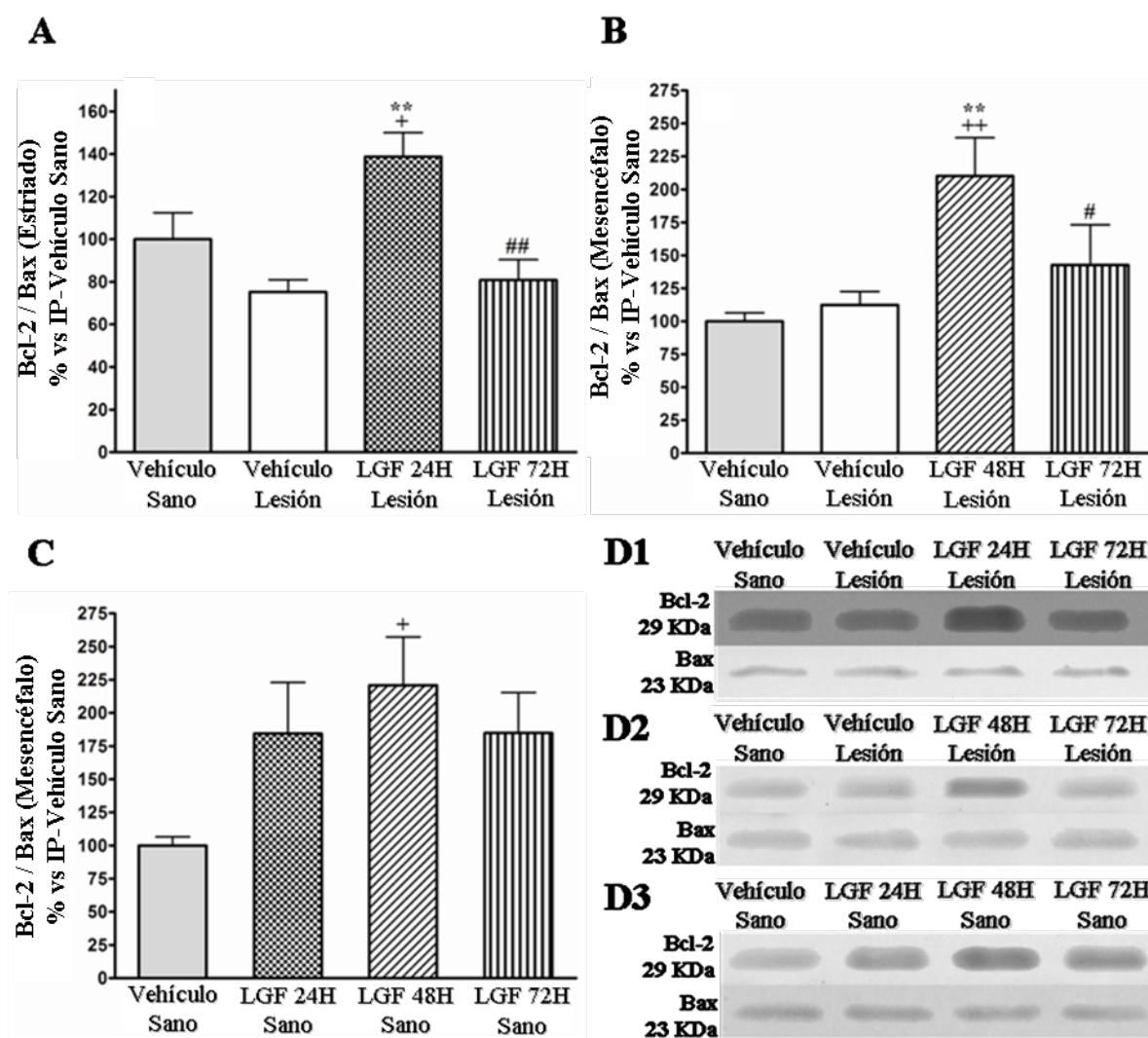


Figura 39. Efectos de la administración de LGF sobre la supervivencia celular en el estriado y en el mesencéfalo. (A): Análisis de la relación Bcl-2/Bax en el estriado sano de los animales del grupo IP-Vehículo (barras grises) y en el estriado lesionado de los grupos: IP-Vehículo (barras blancas), IP-LGF 24H (barras punteadas) e IP-LGF 72H (barras rayadas en vertical). La ratio Bcl-2/Bax en el grupo IP-LGF 24H (A) fue mayor en comparación con el resto de grupos estudiados. **(B):** Estudio de la relación Bcl-2/Bax en el mesencéfalo sano de los animales del grupo IP-Vehículo (barras grises) y en el mesencéfalo lesionado de los grupos: IP-Vehículo (barras blancas), IP-LGF 48H (barras rayadas en diagonal) e IP-LGF 72H (barras rayadas en vertical). La ratio Bcl-2/Bax en el grupo IP-LGF 48H (B) fue mayor en comparación con el resto de grupos experimentales. **(C):** Análisis de la ratio Bcl-2/Bax en el mesencéfalo sano de los animales de los grupos IP-Vehículo (barras grises), IP-LGF 24H (barras punteadas), IP-LGF 48H (barras rayadas en diagonal) e IP-LGF 72H (barras rayadas en vertical). La ratio Bcl-2/Bax en el grupo IP-LGF 48H fue mayor en comparación con el resto de grupos experimentales. En D1, D2 y D3 se muestran los *Western blots* representativos de las gráficas representadas en A, B y C respectivamente. Los resultados representan la media \pm EEM de 6 a 14 animales independientes. ** $p \leq 0,01$ vs grupo IP-Vehículo lesionado. + $p \leq 0,05$ y ++ $p \leq 0,01$ IP-Vehículo Sano. ## $p \leq 0,01$ vs grupo IP-LGF 24H (A). # $p \leq 0,05$ IP-LGF 48H (B).

Por otro lado, se llevó a cabo el estudio inmunohistoquímico de la expresión de Bcl-2 en las secciones coronales de la SNpc procedentes de los animales lesionados con

Resultados

6-OHDA que fueron tratados con una única dosis de LGF ó vehículo. La lesión con la neurotoxina no afectó a la expresión de Bcl-2 en la SNpc de los grupos analizados (Figura 40 A y 40B). Sin embargo, el número de células Bcl-2+ halladas en la SNpc lesionada del grupo IP-LGF 48H fue significativamente mayor en comparación con lo observado en la SNpc sana y lesionada del grupo IP-Vehículo (Figura 40C y 40D)

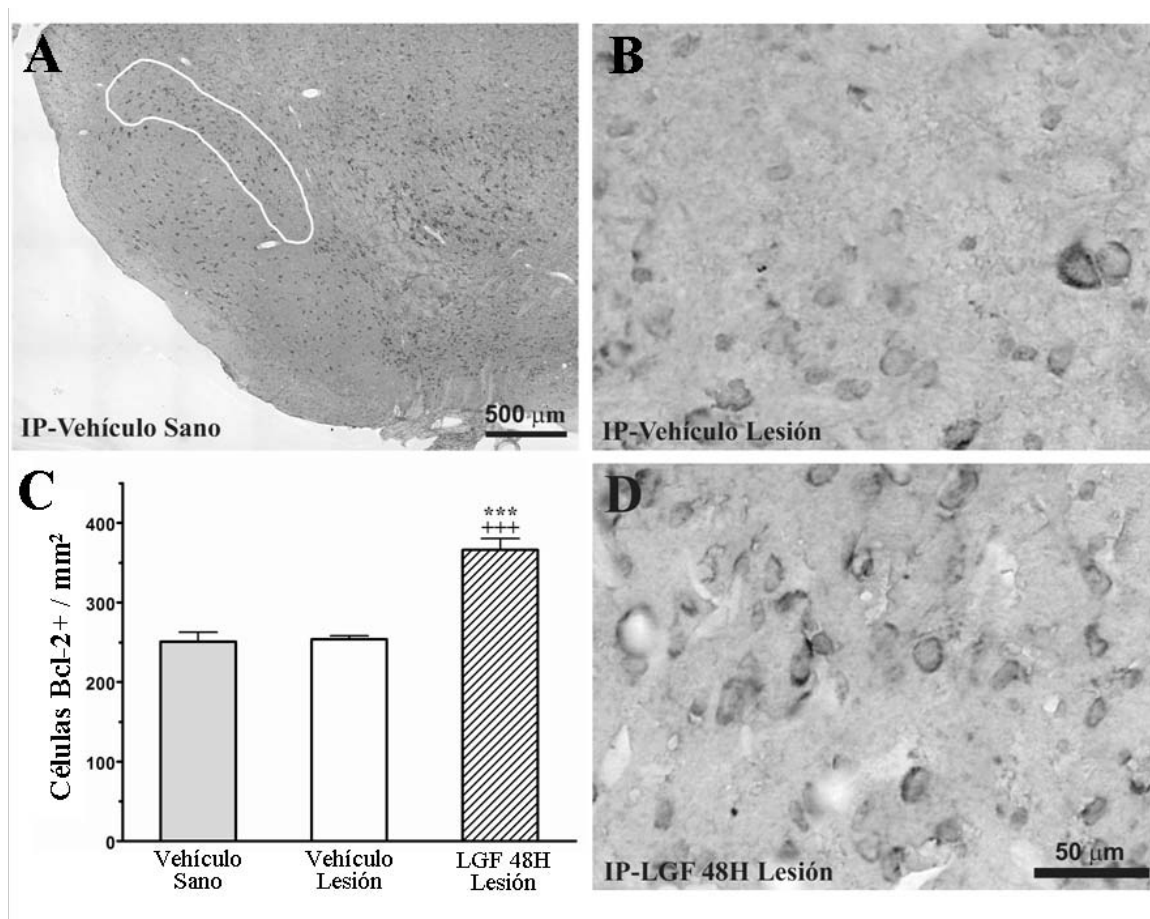


Figura 40. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de Bcl-2 en la SNpc de los animales tratados con LGF. Las imágenes en A, B y D muestran la inmunotinción frente a Bcl-2 en la SNpc sana de los animales del grupo IP-Vehículo (A) y en la SNpc lesionada de los grupos IP-Vehículo (B) e IP-LGF 48H (D). La SNpc fue delimitada en las secciones coronales previamente teñidas frente a TH (área delimitada en A, ver material y métodos). Barra de la escala; 500 μ m (A) y 50 μ m (B y D). En C se representa el número de células Bcl-2+ halladas en la SNpc sana de los animales del grupo IP-Vehículo (barra gris) y en la SNpc lesionada de los grupos IP-Vehículo (barra blanca) e IP-LGF 48H (barra rayada en diagonal). Nótese el incremento significativo del número de células Bcl-2+ en el grupo IP-LGF 48H. Los resultados representan la media \pm EEM de 4 a 6 animales independientes. *** $p \leq 0,001$ vs grupo IP-Vehículo lesionado y $^{+++}p \leq 0,001$ IP-Vehículo Sano.

4. IMPLANTES DE CÉLULAS MADRE NEURALES E INFUSIÓN DE LGF

4.1 Efectos de la infusión IS de LGF sobre la distribución de las células madre neurales implantadas.

Las células madre neurales (CMN) están consideradas como posibles candidatas para su uso en terapias de reemplazo celular en patologías del sistema nervioso por su capacidad de autorrenovación y de diferenciación *in vitro*, pero su uso en la EP sigue sin ser efectivo debido a la reducida tasa de supervivencia y de diferenciación de los implantes. Varios estudios sugieren que la co-administración de factores neurotróficos mejoran la eficiencia de los implantes de CMN (Rosenblad y cols. 1996; Liu y Huang. 2007). Debido a que los resultados de los apartados previos indican que el LGF tiene capacidad neurogénica y de estimular mecanismos de supervivencia celular se llevaron a cabo una serie de experimentos de coadministración de CMN y LGF en ratas lesionadas con 6-OHDA.

Los animales recibieron los implantes de CMN en el estriado denervado en combinación con la infusión intraestriatal durante 15 días de vehículo (IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS) ó de LGF 160 ng/día/rata (IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS). En el grupo de animales IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS, la mayoría de las células implantadas, analizadas por inmunotinción frente a BrdU, estaban distribuidas en toda la superficie estriatal mostrando una mayor densidad en la zona de inyección y en el parénquima estriatal adyacente (Figura 41A). Además, las células implantadas fueron capaces de migrar caudalmente unos 2 mm desde la zona de implante, ocupando el área mas ventral del estriado, el globo pálido, la cápsula interna y el tálamo adyacente. En el parénquima estriatal, las células implantadas BrdU+ estaban localizadas dentro de los paquetes de axones mielinizados, próximas a neuronas -tubulina III+ estriatales, mostrando una morfología parecida a la de las células satélite gliales que rodean a las neuronas de los ganglios dorsales (Figura 41E). Las células implantadas también fueron halladas en la ZSV (Figura 41C) y en asociación con los vasos sanguíneos positivos para laminina (Figura 41F). La infusión intraestriatal de LGF no afectó ni a la distribución ni a la localización de las CMN implantadas en el estriado. Sin embargo, en el nivel donde se localizó la inyección del implante, el parénquima estriatal de los animales del grupo IS-LGF-6-

Resultados

OHDA-CÉLULAS mostró significativamente un mayor número de células BrdU+ implantadas en comparación con el grupo IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS (Figura 42A). Este efecto no fue observado al analizar el número de células BrdU+ halladas en regiones posteriores del estriado [102 ± 46 (n=3) y 80 ± 32 (n=4) células BrdU+/mm² en el grupo IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS y en el grupo IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS, respectivamente].

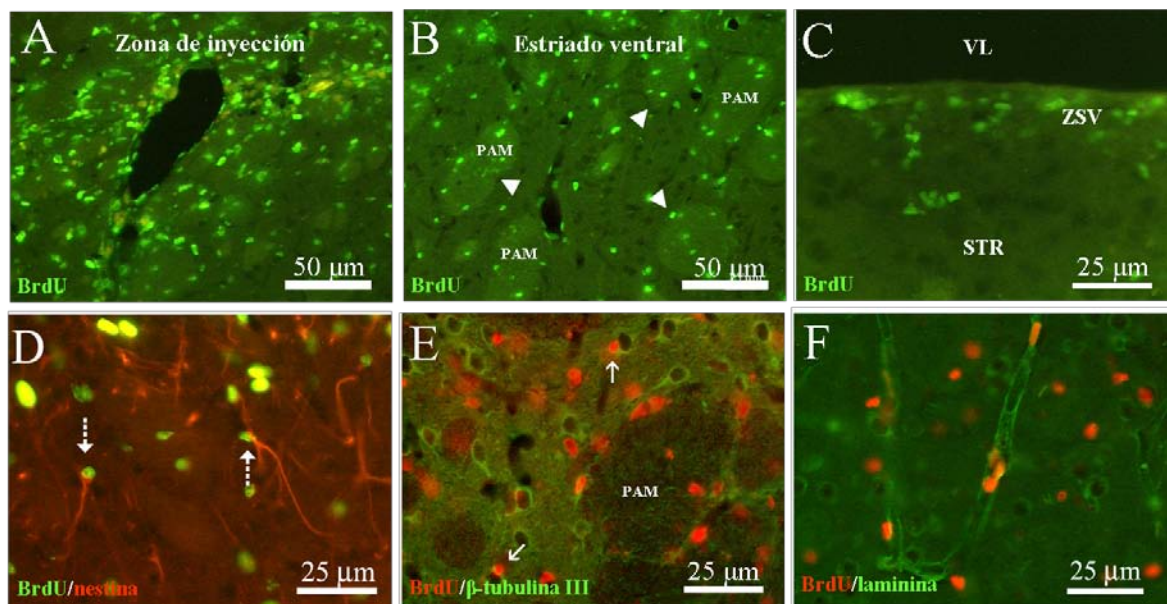


Figura 41. Distribución de las CMN implantadas en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. Dos semanas después del fin de la infusión IS de vehículo se realizó la inmunotinción para BrdU en toda la superficie estriatal (A y B, verde) y en la ZSV (C, verde), hallándose la mayor intensidad de marcaje en la zona de la inyección del implante (A, verde). En D, E y F se muestra el doble inmunomarcado para BrdU (D, verde, E y F, rojo), nestina (D, rojo), β-tubulina III (E, verde), o laminina (F, verde). Nótese que en el parénquima estriatal varias células BrdU+ fueron a su vez nestina+ (D, flechas blancas discontinuas) y como las células implantadas se distribuyeron en los paquetes de axones mielinizados (B, puntas de flechas blancas), alrededor de las neuronas β-tubulina III+ (E, flechas) y en los vasos sanguíneos laminina+ (F). PAM, paquetes de axones mielinizados; Str, estriado; VL, Ventrículo Lateral; ZSV, zona subventricular. Barra de la escala; 50 μm (A y B) y 25 μm (C-F).

Para determinar si la existencia de una lesión en la vía dopaminérgica facilita la capacidad del LGF para incrementar el número de células BrdU+ implantadas en el estriado, un grupo de animales sanos recibió un implante de CMN en combinación con la infusión intraestriatal durante 15 días de vehículo (IS-vehículo-SANAS-CÉLULAS) ó de LGF (IS-LGF-SANAS-CÉLULAS). De manera similar a lo hallado en el estriado

lesionado, el número de células BrdU+ fue significativamente mayor en el estriado de los animales del grupo IS-LGF-SANAS-CÉLULAS (Figura 42B).

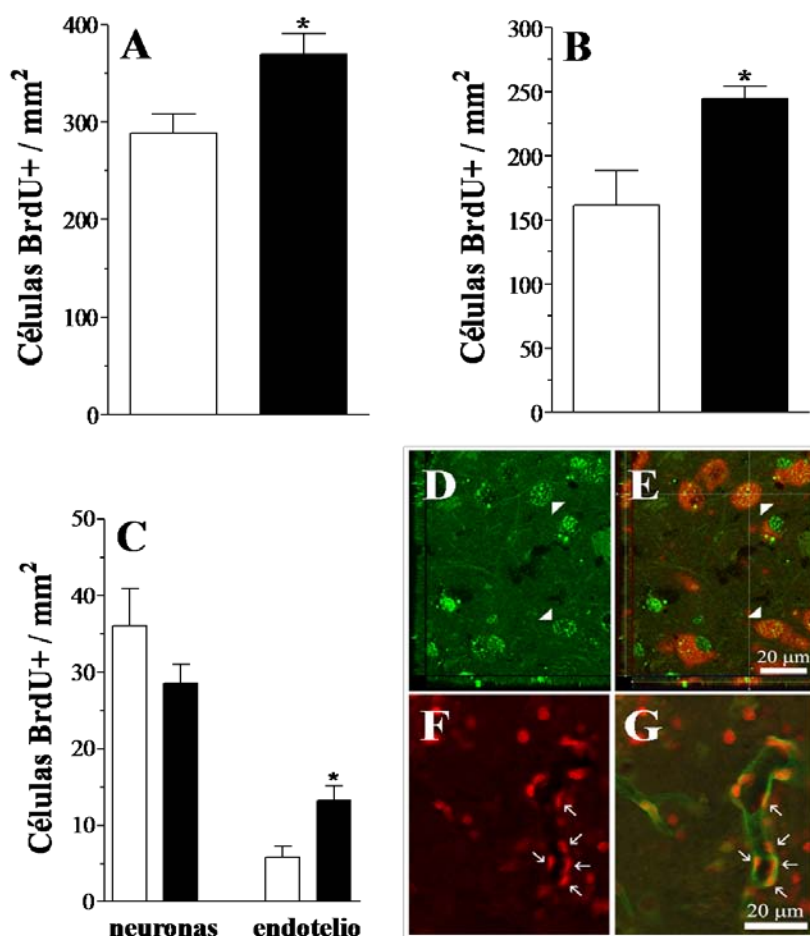


Figura 42. Efectos de la infusión intraestriatal de LGF sobre la supervivencia y la diferenciación de las CMN implantadas. Las CMN marcadas con BrdU fueron implantadas en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA (A, C y D-G) y de ratas sanas (B). Acto seguido, se inició la infusión intraestriatal durante 15 días de vehículo (barras blancas) ó de LGF (barras negras). El estudio de la zona de implante (zona 2, +1.0 mm desde bregma) reveló que la infusión IS de LGF incrementó significativamente el número de células implantadas BrdU+ en el estriado del grupo IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS (A) y en el grupo IS-LGF-SANAS-CÉLULAS (B). En C se muestra el porcentaje de células implantadas BrdU+ que se diferenciaron hacia neuronas maduras NeuN+ (C, neuronas) ó mostraron un fenotipo endotelial (C, endotelio) en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. Nótese el incremento significativo del número de células con fenotipo endotelial en el grupo IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS. Los paneles de D a G muestran la inmunotinción para BrdU (D, verde y F, rojo), NeuN (E, rojo), y laminina (G, verde). Nótese como en el estriado lesionado de las ratas del grupo IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS, varios núcleos BrdU+ fueron a su vez NeuN+ (D y E, puntas de flecha blancas) y como las células implantadas localizadas en los vasos sanguíneos mostraron morfología endotelial (G y F, flechas blancas). Los resultados representan la media \pm EEM de 3 a 5 animales independientes. $p < 0,05$ vs los grupos IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS (A y C) ó IS-vehículo-SANAS-CÉLULAS (B). Barra de la escala; 20 μ m (D-G).

4.2 Estudio de los fenotipos celulares derivados de las CMN implantadas.

La proteína nestina es expresada por las CMN y por los precursores neurales indiferenciados (Reimers y cols. 2001; Lobo y cols. 2003; Bazan y cols. 2004). Como se muestra en la figura 41D, solamente se halló un pequeño número de células implantadas BrdU+ que comarcaron con nestina tanto en el estriado lesionado del grupo IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS como en el estriado lesionado del grupo IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS. Para determinar si las CMN implantadas podían diferenciarse hacia diferentes tipos celulares se llevaron a cabo dobles inmunomarcajes frente a BrdU y marcadores neurales y no neurales. Tanto los animales del grupo IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS como los del grupo IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS mostraron células BrdU+ que coexpresaron DCX (Figura 43A) ó β -tubulina III (Figura 43B). Además, alrededor del 12% de células implantadas BrdU+ observadas en ambos grupos experimentales fueron a su vez NeuN+ (Figura 42C, D y E). Estos resultados indican que en el estriado denervado de las ratas lesionadas con 6-OHDA puede tener lugar la diferenciación de las CMN hacia fenotipos neuronales.

Las células implantadas BrdU+ también fueron capaces de diferenciarse hacia los fenotipos gliales presentes en el sistema nervioso central adulto ya que se hallaron células BrdU+ que comarcaron con GFAP (Figura 43D) o con el marcador de oligodendrocitos RIP (Figura 43E) en el estriado lesionado del grupo IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS y en el del grupo IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS. Por otro lado, el $23 \pm 5,6\%$ (n=6) de las células BrdU+ halladas expresaron a su vez IB4 y mostraron morfología de microglía (Figura 43F). En el nivel de la cánula se localizaron varias células BrdU+/IB4+ con la apariencia de macrófagos activados y con abundantes lisosomas en su citoplasma (Figura 43C). Estos resultados reflejan la capacidad de las CMN implantadas para diferenciarse hacia fenotipos celulares derivados del sistema hematopoyético.

En el apartado anterior se menciona la frecuente localización de las células implantadas BrdU+ en las proximidades de los vasos sanguíneos. Un número significativo de estas células se integró en los vasos sanguíneos mostrando una morfología similar a la de las células endoteliales (Figura 42F). Debido a que estas células fueron localizadas en las paredes de los vasos sanguíneos positivos para laminina (Figura 42G), podemos proponer que las CMN implantadas pudieron diferenciarse hacia un fenotipo endotelial.

Cabe destacar que estas células fueron halladas tanto en vasos sanguíneos grandes, los cuales probablemente ya estaban presentes en el parénquima estriatal antes de realizarse el implante, como en vasos mas pequeños que podrían ser de nueva generación debido a su localización próxima a la zona de inyección del implante. En el parénquima estriatal de los animales de los grupos IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS e IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS se hallaron células BrdU+ dentro de los vasos sanguíneos, pero el número de células que mostraron la morfología de células endoteliales fue significativamente mayor en el grupo IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS (Figura 42C).

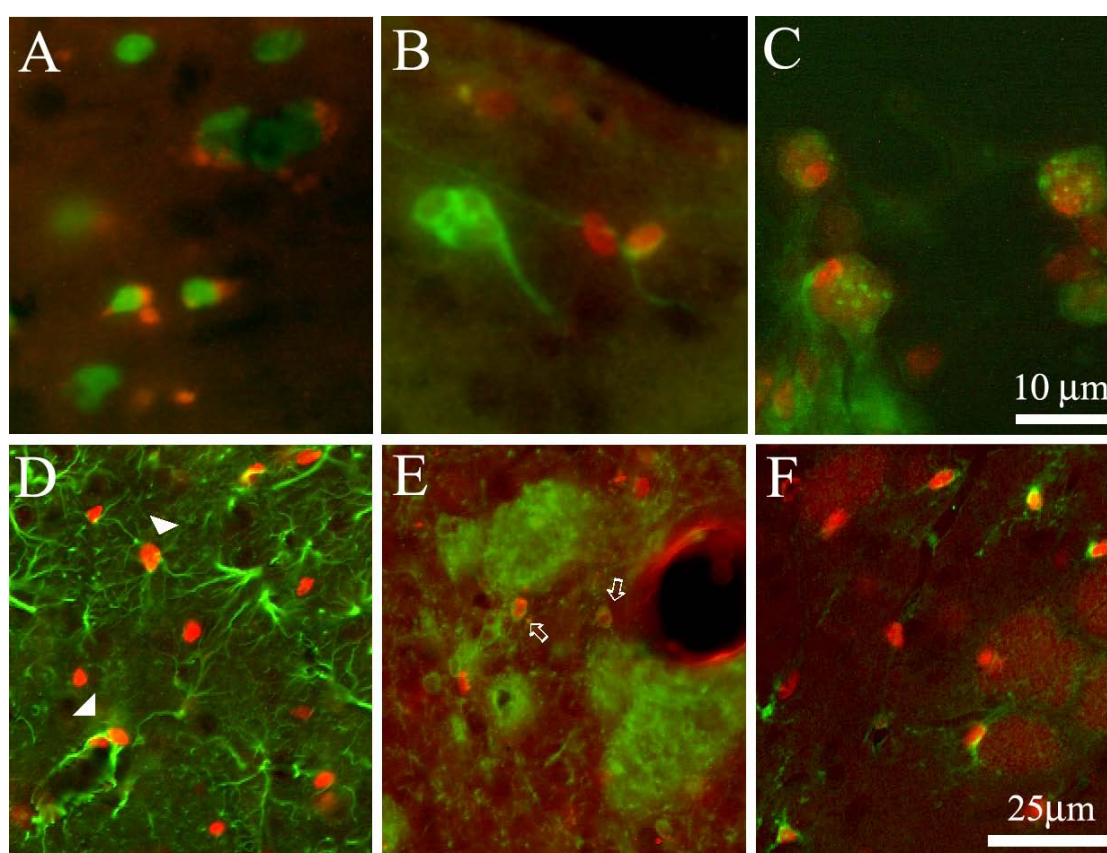


Figura 43. Fenotipos celulares neurales y no neurales derivados de las CMN implantadas en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. Las células derivadas de las neuroesferas y marcadas con BrdU fueron implantadas en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA (A, verde, B-F rojo). A continuación, se inició la infusión durante 15 días de vehículo en el estriado lesionado (IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS). Dos semanas después del fin de la infusión, se observó que las células implantadas BrdU+ coexpresaron los marcadores neuronales DCX (A, rojo) y β -tubulina III (B, verde). Además, las células implantadas se diferenciaron a astrocitos GFAP+ (D, verde, puntas de flecha) y a oligodendrocitos RIP+ (E, verde, flechas). En C y F se muestra como una población de células implantadas BrdU+ comarcó con Isolectina IB4 mostrando morfología de macrófagos activados (C, verde) y morfología de microglía (F, verde). Barra de la escala; 10 μ m (A-C) y 25 μ m (D-F).

4.3 Efectos de las CMN implantadas sobre la conducta rotacional y la innervación positiva para tirosina hidroxilasa.

La conducta rotacional inducida por apomorfina del grupo de animales IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS disminuyó significativamente 3 semanas después del inicio de la infusión en comparación con el grupo lesionado con 6-OHDA que solo recibió la infusión intraestriatal de vehículo y en el cual no hubo implante de CMN (IS-vehículo-6-OHDA) (Figura 44). Cabe destacar que en el grupo IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS la conducta rotacional se redujo notablemente en comparación con los grupos IS-vehículo-6-OHDA e IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS (Figura 44).

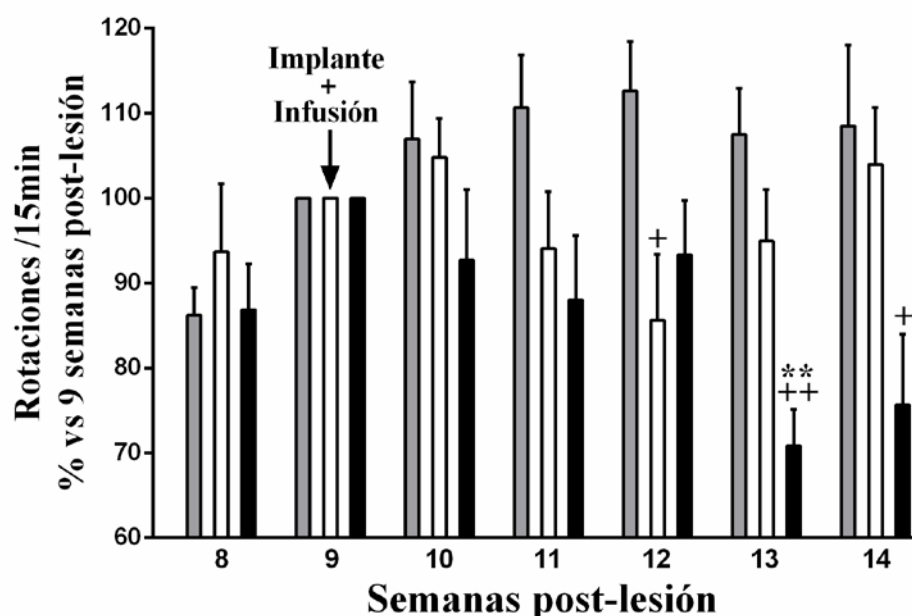


Figura 44. Efectos de la coadministración de LGF y CMN sobre la conducta rotacional de las ratas hemiparkinsonianas. Estudio de la conducta rotacional inducida por apomorfina de los animales de los grupos IS-vehículo-6-OHDA (barras grises), IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS (barras blancas) e IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS (barras negras). Nótese como la conducta rotacional mejoró en el grupo IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 a 8 animales independientes. ⁺ $p \leq 0,05$ y ⁺⁺ $p \leq 0,01$ vs grupo IS-vehículo-6-OHDA. ^{*} $p \leq 0,05$ y ^{**} $p \leq 0,01$ vs el grupo IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS.

Para determinar si la mejoría en la conducta rotacional fue debida a un incremento en la innervación dopaminérgica y/o a la diferenciación de las CMN implantadas hacia neuronas catecolaminérgicas, se llevaron a cabo dobles inmunomarcajes frente a TH y BrdU en el estriado lesionado de los animales pertenecientes a los grupos IS-vehículo-6-

OHDA-CÉLULAS e IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS. Como se muestra en el apartado de infusión intraestriatal, los estriados de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA que no recibieron ni implantes de CMN ni infusiones intracerebrales no presentaron neuronas TH+ y únicamente el $5,5 \pm 1,9\%$ de la estructura mostró inervación TH+. Se observaron resultados similares en el estriado de los animales del grupo IS-vehículo-6-OHDA donde solamente el $4,0 \pm 1,3\%$ de la estructura mostró inervación TH+, en comparación con el grupo de ratas sanas (Figuras 45A y 45B). Ninguno de los animales de los grupos experimentales analizados mostraron neuronas TH+ / BrdU+ en el estriado, sugiriendo que las CMN implantadas en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA no fueron capaces de diferenciarse hacia neuronas con fenotipo dopaminérgico. Sin embargo, el estriado de las ratas pertenecientes al grupo IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS mostró un $23 \pm 7\%$ de la estructura con inervación TH+ (Figuras 46A y 45C), en comparación con el estriado del grupo IS-vehículo-6-OHDA. Los animales del grupo IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS también presentaron un ligero incremento de la inervación TH+ en el estriado lesionado pero no se observaron diferencias significativas al compararse con el grupo IS-vehículo-6-OHDA o con el grupo IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS (Figura 46A).

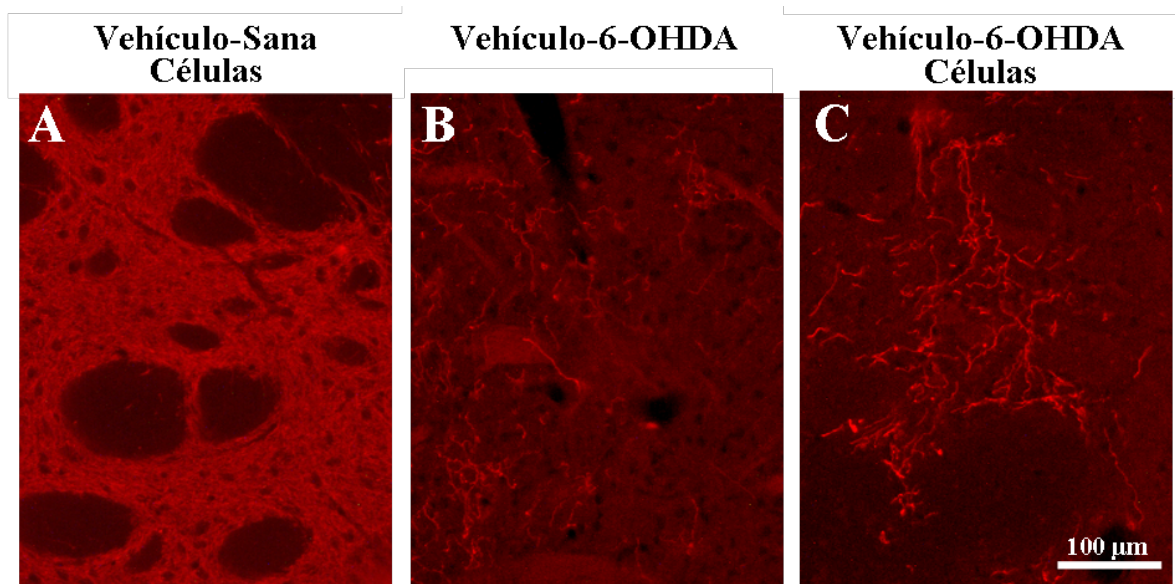


Figura 45. Estudio de la expresión de TH en el estriado de animales con implantes de CMN. Inmunotinción frente a TH en el estriado de los grupos IS-vehículo-SANAS-CÉLULAS (A), IS-vehículo-6-OHDA (B) e IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS (C). Nótese como en el grupo IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS se observó una mayor densidad de terminales TH+ que el grupo IS-vehículo-6-OHDA. Barra de la escala; 100 µm (A-C).

Resultados

El porcentaje de área estriatal ocupada por innervación TH+ fue dependiente de la zona donde fueron halladas las CMN e independiente de que la infusión intraestriatal fuese de vehículo ó LGF. De este modo, las ratas lesionadas con 6-OHDA, en las que implante de CMN se halló en el nivel +1,0 mm desde Bregma, mostraron una mayor innervación TH+ en comparación con los animales en los que el implante fue localizado a +0,2 mm desde Bregma (Figura 46B).

Como se muestra en el apartado de infusión intraestriatal de LGF, las ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA muestran una pérdida significativa en el número de neuronas TH+ de la SNpc. De igual modo, se hallaron escasas neuronas TH+ en la SNpc lesionada de las ratas de los grupos IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS ($1 \pm 0,6$ células TH+/sección) (n=3) e IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS ($1,3 \pm 1,3$ células TH+/sección) (n=3).

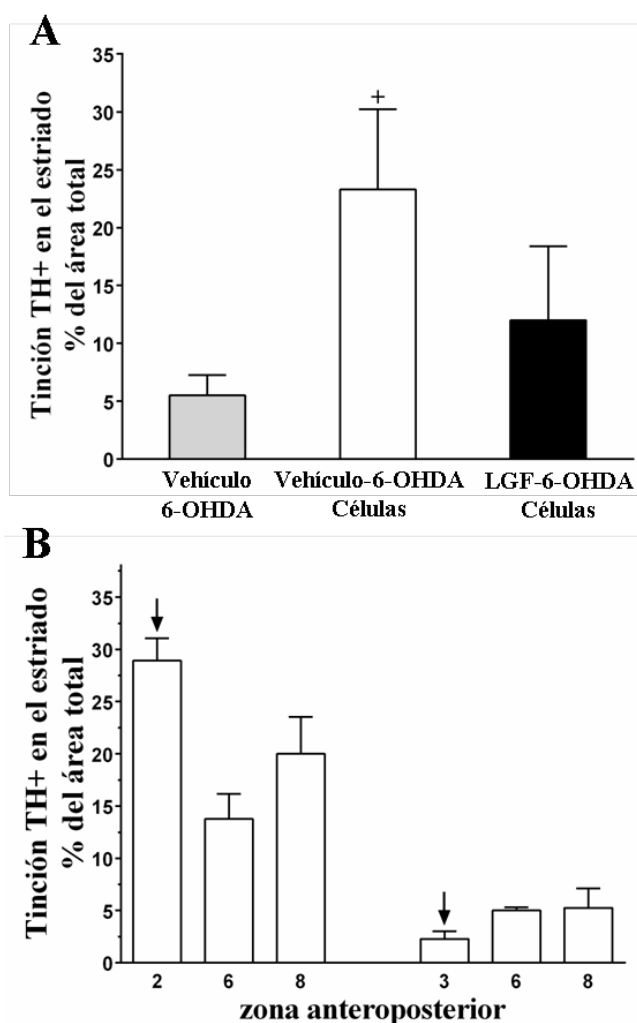


Figura 46. Efectos de las CMN implantadas y de la infusión de LGF sobre la expresión de TH en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. En A se muestra el porcentaje de innervación TH+ hallada en el estriado lesionado de los grupos IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS (barras blancas), IS-LGF-6-OHDA-CÉLULAS (barras negras) y en el grupo IS-vehículo-6-OHDA (barras grises). En B se muestra como la innervación TH+ en el estriado lesionado del grupo IS-vehículo-6-OHDA-CÉLULAS dependió de la zona en donde tuvo lugar el implante de las CMN (C, flechas negras). De este modo, la innervación TH+ observada en el estriado fue mayor en aquellos animales en los que el implante fue hallado en la zona 2 (+1,0 mm desde Bregma) que en los animales donde el implante se localizó en la zona 3 (+0,2 mm desde Bregma). Los resultados representan la media \pm EEM de 3 a 8 animales independientes. $p < 0,05$ grupo IS-vehículo-6-OHDA.

VII.-DISCUSIÓN

1. EFECTOS DEL LGF SOBRE LOS MARCADORES DOPAMINÉRGICOS Y LA FUNCIÓN MOTORA.

Los resultados de la administración intraestriatal (IS) e intraperitoneal (IP) de LGF muestran que este factor es capaz de incrementar la innervación TH+ y la expresión de esta proteína en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. Además, los resultados ponen de manifiesto la capacidad de las CMN para estimular el crecimiento de los terminales TH+ estriatales. El tratamiento con LGF IP también fomenta la expresión de DAT en el estriado y protege parcialmente a las neuronas dopaminérgicas de la SN del daño inducido por la neurotoxina. Por otro lado, tanto la administración IS e IP como la coadministración de LGF y CMN, mejoran la conducta rotacional inducida por apomorfina en este modelo experimental de EP.

La administración de LGF en el estriado podría proteger a las neuronas dopaminérgicas de la SN de la muerte celular. Este tipo de efecto ya ha sido previamente descrito para otras sustancias como el BDNF, GDNF ó VEGF en animales lesionados con 6-OHDA (Levivier y cols. 1995; Kirik y cols. 2001; Ogunshola y cols. 2002; Yasuhara y cols. 2004). En el caso del VEGF, los últimos autores demostraron una significativa preservación tanto de las neuronas TH+ en la SN como de las fibras TH+ en el estriado (Yasuhara y cols. 2004). Los resultados de la administración IS de LGF revelan que tanto en el grupo control de la lesión como en el grupo IS-vehículo, solo un 5% del área del estriado lesionado mostró innervación TH+; mientras que el grupo IS-LGF mostró inmunorreactividad frente a TH en el 50% del área estriatal de las secciones coronales estudiadas. Además, la administración IP de este factor también fue capaz de fomentar tanto la innervación TH+ como la expresión de esta proteína en el estriado lesionado con 6-OHDA e incluso preservó parcialmente a las neuronas dopaminérgicas de la SN de los efectos nocivos de esta toxina. Sin embargo, la infusión IS de LGF no protegió a estas neuronas de la degeneración inducida por la 6-OHDA ya que la cantidad observada de estas células fue similar tanto el grupo control de la lesión como en los animales con infusión IS de LGF o vehículo. De este modo, los resultados de la administración IS e IP de LGF ponen de manifiesto la capacidad de este factor para promover el crecimiento de los terminales dopaminérgicos que persisten en el estriado tras la lesión con 6-OHDA, independientemente de la existencia o no de un efecto neuroprotector en la SN.

El hecho de que los animales tratados con LGF tuvieran una significativa mejoría en la coordinación motora, y en la conducta rotacional inducida por apomorfina está en concordancia con la capacidad mostrada por este factor para restaurar parcialmente los niveles de dopamina en el estriado lesionado. En este sentido, también hay que mencionar que el transportador DAT que se localiza en los terminales dopaminérgicos, está implicado en la recaptura de la dopamina y se utiliza como marcador para evaluar la integridad del sistema dopaminérgico (Afonso-Oramas y cols. 2009; Liu y cols. 2009; Frye y cols. 2010; Smith y cols. 2011). Como se muestra en el apartado 3 de resultados, la administración IP de LGF previno la reducción de la inmunorreactividad y de la expresión de DAT, ejercida por la 6-OHDA en el estriado lesionado. Además, la administración IP de LGF fomenta el tráfico de DAT en las neuronas dopaminérgicas ya que en los animales tratados crónicamente con este factor la expresión de DAT se localizó en los terminales TH+, al contrario de lo hallado en los animales tratados con vehículo, donde la inmunorreactividad frente a DAT se halló confinada en pequeños puntos que probablemente representaban botones sinápticos. Sin embargo, es necesario llevar a cabo experimentos a largo plazo para determinar si el LGF, infundido intraestriatalmente o administrado intraperitonealmente, es capaz de restaurar completamente el metabolismo dopaminérgico y el comportamiento motor en animales lesionados con 6-OHDA. En resumen, la infusión IS de LGF únicamente induce el crecimiento de los terminales estriatales TH+, mientras que la administración IP del factor induce un efector neuroprotector tanto en las neuronas dopaminérgicas de la SN como en los terminales TH+ del estriado lesionado con 6-OHDA.

Muchos trabajos proponen que la administración intracerebral de factores tróficos potencia la neurogénesis tanto en el cerebro sano (Craig y cols. 1996; Kuhn y cols. 1997; Zigova y cols. 1998; Pencea y cols. 2001; Jin y cols. 2002) como en el cerebro dañado (Fallon y cols. 2000; Sun y cols. 2003; Cooper y Isacson. 2004). Además, existen estudios que podrían indicar la existencia de neurogénesis en la SN de ratas adultas lesionadas con 6-OHDA (Zhao y cols. 2003). La generación de nuevas neuronas dopaminérgicas podría explicar el incremento de la innervación TH+ observado después de la administración IS ó IP de LGF en el estriado de los animales lesionados con 6-OHDA. El doble inmunomarcaje mostró pocas células -tubulina III+/BrdU+ en los estriados de los animales con infusión IS de LGF o vehículo; tampoco se hallaron células TH+ en los estriados de estos animales. Por consiguiente, no se observaron nuevas neuronas TH+ en

los animales IS-LGF 15d después de 2 semanas de infusión del factor. Además, tampoco se localizaron neuronas TH+/BrdU+ en el estriado de los animales con infusión IP de LGF ni se hallaron nuevas neuronas dopaminérgicas en la SN lesionada de los animales con administración IP ó IS de LGF, hecho que indica la ausencia de neurogénesis dopaminérgica en ambas regiones vinculada a la acción del LGF cuando éste es administrado en el estriado o de manera intraperitoneal. En el apartado 4 de resultados, se muestra que el LGF incrementa la supervivencia de los precursores neurales implantados en el estriado lesionado de animales hemiparkinsonianos. La administración IP de LGF protege a las neuronas dopaminérgicas localizadas en la SN del hemisferio lesionado con 6-OHDA. Esta protección frente a la neurotoxicidad podría efectuarse de modo similar a lo anteriormente comentado sobre los efectos del GDNF y el VEGF en ratas lesionadas con 6-OHDA (Kirik y cols. 2001; Ogunshola y cols. 2002; Yasuhara y cols. 2004; Cohen y cols. 2011).

De manera similar a lo observado en los experimentos de administración IS e IP de LGF, no se observaron nuevas neuronas TH+/BrdU+ a los 7, 15 ó 30 días después del inicio de la infusión ICV de LGF. Tampoco se observaron mejorías en la conducta rotacional relacionadas con la administración ICV del factor. Debido a que las ratas que recibieron la administración IS e IP de LGF mostraron una mayor inmunorreactividad frente a TH y una mejoría en la conducta rotacional y que la infusión ICV promovió la aparición de nuevas neuronas NeuN+/BrdU+ y DCX+/BrdU+, es necesario realizar experimentos con un período de postinfusión ICV de LGF mas largo para así determinar si las nuevas neuronas generadas pueden adquirir el fenotipo dopaminérgico capaz de mejorar la función motora en las ratas lesionadas con 6-OHDA. Además, las neuronas de nueva generación pueden requerir de señales adicionales procedentes del mesencéfalo o del cerebro anterior para diferenciarse a neuronas dopaminérgicas maduras, como se ha sugerido en trabajos en los que se ha llevado a cabo la infusión intracerebral de TGF- α (de Chevigny y cols. 2008).

Los implantes de CMN se diferenciaron a neuronas, pero no se observaron neuronas TH+ que hubiesen derivado a partir de las células implantadas, en ninguna de las condiciones experimentales analizadas en este estudio. Bajo condiciones específicas, las CMN con las que trabajamos en nuestro laboratorio son capaces de diferenciarse hacia neuronas TH+ *in Vitro* (Lopez-Toledano y cols. 2004; Calatrava-Ferreras y cols. 2012).

Los resultados indican que el estriado lesionado carece de las señales necesarias para que tenga lugar el proceso de diferenciación de las CMN hacia neuronas dopaminérgicas. Un hallazgo destacable fue que la innervación TH+ en el estriado fue mayor cuando las CMN fueron localizadas en niveles anteriores (Zona 2, +1.0 mm desde bregma), en comparación con lo hallado cuando los implantes fueron mas posteriores (Zona 3, +0,2 mm desde Bregma). Además, hay trabajos que proponen la capacidad de los implantes de progenitores neurales a la hora de liberar factores neurotróficos y de ejercer efectos positivos en el estriado, la SN y en la conducta rotacional de las ratas hemiparkinsonianas (Wei y cols. 2007; Haas y cols. 2008). De este modo, teniendo en cuenta que muchas de las neuronas dopaminérgicas de la SN proyectan hacia zonas anteriores del estriado (Gerfen y Wilson. 1996; Merello y Cammarota. 2000), la presencia de las CMN implantadas en estas áreas podría explicar el incremento en la innervación TH+ y la mejora funcional observada en nuestro estudio.

Los resultados del apartado 4 también indican que la conducta rotacional inducida por apomorfina mejoró en los animales lesionados con 6-OHDA que recibieron el implante de CMN, hecho que también ha sido constatado en otros estudios (Zhu y cols. 2009). Varias células implantadas fueron localizadas en las proximidades de neuronas estriatales mostrando una localización similar a la de las células satélite gliales del sistema nervioso periférico. Dado que las células satélite gliales son capaces de sintetizar neurotrofinas (Wetmore y Olson. 1995), se podría argumentar que las CMN implantadas actúan como una fuente de factores tróficos para las neuronas estriatales y por tanto son capaces de mejorar su función. Otra posibilidad podría ser que las nuevas neuronas generadas podrían haber sustituido parcialmente a las neuronas estriatales afectadas por la ausencia de dopamina debida a la lesión con 6-OHDA. Además, la conducta rotacional mejoró significativamente en los animales con implante de CMN e infusión intraestriatal de LGF, efecto que también fue observado en los animales que únicamente recibieron la administración IS o IP de LGF. Los resultados de coadministración de LGF y CMN también indican que el factor puede inducir la diferenciación de las células implantadas hacia el fenotipo endotelial ya que una pequeña proporción de estas células mostró morfología similar a la de las células endoteliales y fue marcada con anticuerpos anti-laminina. Además, el LGF es capaz de estimular la síntesis del VEGF (Martín-Hidalgo y cols. 2007a), cuyo papel como estimulador de la angiogénesis ha sido ampliamente referido por otros autores (Ferrara y cols. 2003; Rosenstein y Krum. 2004; Yasuhara y

cols. 2004). Este efecto angiogénico pudo derivar en una mejor irrigación del tejido huésped y en un mayor aporte de factores neurotróficos (Dong y cols. 2007). Estos resultados revelan la capacidad del LGF y de las CMN implantadas para generar nuevos vasos sanguíneos los cuales podrían jugar un papel importante en la regeneración del tejido cerebral dañado. Por otro lado, el LGF pudo también mejorar la funcionalidad de las neuronas dopaminérgicas restantes mediante la estimulación de la síntesis de factores tróficos implicados en la supervivencia y/o en la función de estas neuronas (Yasuhara y cols. 2004; Jiang y cols. 2006).

En resumen, los resultados indican que ninguna de las condiciones experimentales han podido dar lugar a la generación de neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, tanto la administración IS o IP de LGF como los implantes de CMN podrían favorecer la generación de un microambiente capaz de propiciar la reinervación de los terminales dopaminérgicos estriatales y la subsiguiente mejoría a nivel motor observada en los animales lesionados con 6-OHDA.

2. EL LGF COMO INDUCTOR DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA NEUROGÉNESIS. EFECTOS DE LA COADMINISTRACIÓN DE CMN Y LGF.

2.1 Papel del LGF en la proliferación celular y la neurogénesis.

Los resultados de la infusión ICV indican que el LGF estimula la proliferación celular de los precursores neuronales de la ZSV y la invasión, por parte de estos precursores, del estriado denervado de ratas lesionadas con 6-OHDA. Además, el estudio de la administración IS de LGF junto con los implantes de CMN muestran que estas células son capaces de sobrevivir en el estriado denervado de ratas lesionadas con 6-OHDA. Las CMN implantadas mantuvieron su pluripotencialidad, de este modo pudieron diferenciarse a neuronas y glía, así como a endotelio y a células del linaje hematopoyético, tales como macrófagos y microglía.

Las células madre neurales, con capacidad de autorrenovación y potencial para generar varios linajes, persisten en la ZSV del cerebro anterior adulto de los mamíferos. La administración *in vivo* de factores tróficos como EGF, TGF- α o VEGF y neurotrofinas, incrementa la expansión de las CMN (Craig y cols. 1996; Kuhn y cols. 1997; Schanzer y cols. 2004), promueve la neurogénesis en el cerebro sano (Palmer y cols. 1999; Pencea y cols. 2001; Jin y cols. 2002) y en el cerebro dañado (Fallon y cols. 2000; Teramoto y cols. 2003; Cooper y Isacson. 2004; Mohapel y cols. 2005; Wang y cols. 2007b). La administración ICV de LGF incrementó la expresión de PCNA y nestina en la ZSV adyacente al ventrículo lateral infundido. Existen estudios que demuestran que la inserción de una cánula en el ventrículo lateral incrementa la proliferación celular en la ZSV (Weinstein y cols. 1996), sugiriendo que esta proliferación puede ser debida al daño mecánico ejercido en esta zona. Los resultados muestran que la infusión ICV de vehículo también incrementó la inmunotinción frente a PCNA en la ZSV de las ratas hemiparkinsonianas. Sin embargo, el nivel de proliferación celular fue menor que el detectado después de la infusión de LGF. Bajo estas condiciones experimentales, la infusión ICV de LGF también estimuló la expresión de nestina en la ZSV en las ratas lesionadas con 6-OHDA. Debido a que se hallaron células doblemente marcadas para PCNA y nestina, los resultados indican que el LGF estimula la proliferación de los precursores neurales localizados en la ZSV de las ratas hemiparkinsonianas. Por otro lado, también se visualizaron dobletes y tripletes de células PCNA+/nestina+ en el parénquima

estriatal, sugiriendo que el LGF también es capaz de estimular la migración de los precursores neurales en proliferación hacia el estriado denervado de las ratas lesionadas con 6-OHDA.

Los precursores neurales de la ZSV dan lugar a una población de neuronas DCX+ cuyo destino final se halla en el bulbo olfatorio (Yang y cols. 2004; Ernst y Christie. 2005). Como muestran los resultados, la incorporación de BrdU incrementó significativamente en el estriado de los animales con infusión ICV de LGF. Además, los experimentos de doble inmunomarcaje mostraron que más del 20% de las células BrdU+ eran células que a su vez expresaban DCX. La mayoría de estas nuevas neuronas halladas en el parénquima estriatal mostraron una morfología redondeada y fueron localizadas cerca de la ZSV, sugiriendo que el nicho neurogénico de precursores neurales es capaz de dividirse y que su progenie migra hacia el parénquima adyacente tras la infusión ICV de LGF. También se hallaron células DCX+ con largos procesos invadiendo el estriado lesionado de los animales infundidos con LGF. Aunque solo un pequeño número de estas células DCX+ coexpresaron BrdU, se puede argumentar que fueron generadas por la infusión del factor ya que la expresión de DCX ha sido considerada como un marcador de neurogénesis (Couillard-Despres y cols. 2005). Además, la incorporación de BrdU únicamente proporciona una estimación relativa del número de células proliferantes debido a diferentes razones tales como la duración de la fase S, la cual es una fracción del ciclo celular completo, el número de células que se hallan en división cuando la BrdU no está presente para su marcaje, y la supervivencia de las nuevas células generadas ya que la muerte celular es un proceso que ocurre normalmente en las regiones neurogénicas (Taupin. 2007). La ausencia de colocalización con nestina o GFAP confirmó que las células DCX+ que invadieron el estriado no eran precursores neurales multipotentes o astrocitos GFAP+. Sin embargo, la morfología de la mayoría de estas células que expresaban DCX, en combinación con la ausencia de expresión de nestina y GFAP, claramente indica que estas células constituyen una población de neuroblastos en migración. Por otro lado, hay que destacar que no se detectó inmunorreactividad frente a DCX en el estriado de los animales con lesión e infusión ICV de vehículo, ni en el estriado de los animales sanos que fueron infundidos con vehículo o LGF en el ventrículo lateral izquierdo (dato no mostrado). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el LGF confiere al estriado denervado algunas propiedades que permiten la migración de neuronas de nueva generación.

El estriado de los animales con infusión ICV de LGF también mostró células BrdU+ que comarcaron con NeuN, un antígeno nuclear expresado por las neuronas maduras. Como proponen otros estudios, las nuevas neuronas del parénquima estriatal podrían ser generadas a partir de células progenitoras multipotentes que residen en la ZSV del cerebro anterior adulto (Laywell y cols. 2000; McGinn y cols. 2004; Ihrie y Alvarez-Buylla. 2008). El hecho de que las neuronas BrdU+/NeuN+ de nueva generación observadas en el estriado de los animales ICV-LGF mostraran una menor inmunoreactividad frente a NeuN, en comparación con las neuronas estriatales adultas, puede sugerir que probablemente estas células forman parte de una población neuronal en estado de maduración procedente de los neuroblastos en migración mencionados anteriormente. Por otro lado, los experimentos de administración IS e IP de LGF en ratas lesionadas con 6-OHDA pusieron de manifiesto la ausencia de generación de nuevas neuronas en el parénquima estriatal. Este hecho sugiere que la eficacia del factor a la hora de estimular la neurogénesis depende en gran medida de la vía de administración utilizada.

2.2 Efectos de la administración conjunta de LGF y CMN.

El factor de crecimiento de hígado no actúa únicamente sobre las CMN del animal adulto, sino que también favorece la viabilidad de los implantes de CMN de origen fetal en el cerebro dañado. La capacidad de supervivencia de las células madre implantadas en el cerebro adulto de los mamíferos es un fenómeno ampliamente constatado (Eriksson y cols. 2003; Bjugstad y cols. 2008; Arias-Carrion y Yuan. 2009). Los resultados muestran que el cerebro adulto de la rata contiene las señales requeridas para la supervivencia de las CMN y que la administración de LGF potencia su capacidad de supervivencia ya que se observó un mayor número células implantadas BrdU+ tanto en el estriado sano como en el estriado denervado de los animales con implante que fueron tratados con el factor.

In vitro, las CMN se diferencian a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage. 2000; Kennea y Mehmet. 2002). El estriado de la rata adulta posibilita la diferenciación y la migración de las CMN implantadas. De este modo, las células BrdU+ que coexpresaron marcadores específicos neuronales y gliales se distribuyeron ampliamente por el parénquima estriatal, incluyendo las zonas mas ventrales de esta estructura. Además, parte de las células implantadas fueron localizadas en la ZSV y en las proximidades de los vasos sanguíneos, dos entornos favorables para el mantenimiento y renovación de las CMN

(Palmer y cols. 2000; Doetsch. 2003; Barami. 2008). La distribución y la diferenciación de las CMN implantadas hacia los fenotipos neurales comentados anteriormente fue independiente de la coadministración de LGF. Sin embargo, el LGF también potenció de manera específica la diferenciación de las CMN implantadas hacia el fenotipo endotelial ya que se halló un mayor número de células BrdU+ con estas características en los vasos sanguíneos de los animales que recibieron la infusión del factor. Además, hay que destacar que las células endoteliales de la vena porta están relacionadas con la acción del LGF en el hígado (Díaz-Gil y cols. 2003).

Por otro lado, estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que las CMN también pueden generar células del linaje hematopoyético (Papavasiliou y cols. 1996; Vescovi y cols. 2002). Aunque estos resultados ya han sido reflejados por otros autores (Levison y cols. 2003), nuestros datos también muestran el potencial hematopoyético de las CMN ya que, en el estriado lesionado de los animales hemiparkinsonianos que recibieron el implante, se observaron tanto macrófagos activados como abundante microglía que habían derivado de las células implantadas. Además, también se ha descrito la capacidad de las CMN implantadas en el estriado a la hora secretar factores y de generar microambientes que regulan la actividad y la función de la microglía de manera muy marcada (Mosher y cols. 2012). Debido a que la microglía también está implicada en la inducción del crecimiento de los terminales dopaminérgicos en el estriado lesionado (Batchelor y cols. 1999; Stanic y cols. 2004) y que en la gran mayoría de los resultados del presente trabajo muestran al LGF como un regulador activo de este tipo celular, podemos sugerir que el posible papel neuroreparador de los implantes de CMN y de la coadministración de este factor también pueda estar mediado por la microglía.

3. POSIBLES CÉLULAS DIANA DEL LGF. PAPEL DEL TNF- α .

3.1 LGF y activación de la microglía.

Nuestros estudios preliminares *in vitro* sugieren que el LGF no actúa directamente sobre las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Gonzalo-Gobernado y cols. 2011). Es por ello, que uno de nuestros objetivos principales fue determinar las células diana y los efectores moleculares que median en las acciones inducidas por la administración de LGF en las ratas lesionadas con 6-OHDA. Los resultados indican que la infusión IS de LGF incrementó significativamente la expresión de PCNA, y el número de células PCNA+ en el estriado. Alrededor del 60% de esas células fueron también positivas para IB4, indicando claramente que el LGF promueve la proliferación de la microglía. La proliferación forma parte de la respuesta de la activación de la microglía. Esta activación también origina una transformación morfológica celular desde formas ramificadas hacia formas mas ameboides (Vilhardt. 2005). El estriado de los animales con infusión IS de LGF también mostró un mayor número de células IB4+ con morfología ameboide. Como el LGF también incrementó la expresión de OX6, podemos argumentar que la administración IS de LGF promueve la activación de la microglía en el estriado hemiparkinsoniano. En el apartado 3 de resultados se muestra que la administración intraperitoneal de LGF también potencia la expresión de varios marcadores relacionados con la activación de la microglía ya que una única inyección intraperitoneal de LGF fue capaz de estimular la expresión transitoria de GLUT-5 en el estriado y de OX6 en el mesencéfalo y en el estriado. Además, el LGF incrementó la proliferación celular, cuantificada mediante el análisis de la expresión de PCNA, y el número de células de microglía en proliferación OX6+/PCNA+. Debido a que la administración intraperitoneal crónica de LGF restauró estos parámetros anteriormente mencionados, podemos pensar que en el Parkinson experimental, la activación de la microglía es un evento temprano y de carácter transitorio en la acción de este factor.

La microglía activada se ha asociado con la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas incluida la enfermedad de Parkinson (Teismann y Schulz. 2004). Además, estas células pueden jugar un papel clave en el desarrollo y la regeneración del sistema nervioso central (Fig. 1) mediante la liberación de factores tróficos y de moléculas de la matriz extracelular (Polazzi y Contestabile. 2002; Streit. 2002; Shein y cols. 2008; Wine y cols. 2009; Hung y cols. 2010; Liang y cols. 2010; Narantuya y cols. 2010; Yuan y

cols. 2010). Asimismo, las evidencias disponibles sugieren que la secreción de GDNF y BDNF por parte de la microglía y/o los macrófagos induce el crecimiento de los terminales dopaminérgicos en el estriado lesionado (Batchelor y cols. 1999; Batchelor y cols. 2002; Batchelor y Howells. 2003; Stanic y cols. 2004). Durante el desarrollo de este trabajo no hemos analizado si la microglía activada por acción del LGF es capaz de sintetizar y liberar estos factores neurotróficos en ratas lesionadas con 6-OHDA, por lo que se requieren experimentos adicionales para verificar esta hipótesis.

La microglía activada también puede desempeñar un papel clave en la neurogénesis (Walton y cols. 2006; Ziv y cols. 2006; Ninkovic y Gotz. 2007), además de dirigir la migración y la diferenciación de los precursores neurales hacia fenotipos gliales (Aarum y cols. 2003; Butovsky y cols. 2006; Nakanishi y cols. 2007). En los ventrículos laterales de los animales infundidos ICV con LGF se observó la formación de engrosamientos celulares positivos para BrdU, similares a los referidos por otros autores que han utilizado otros factores tróficos (Kuhn y cols. 1997; Pencea y cols. 2001; Cooper y Isacson. 2004). Aunque muchas de estas células de nueva generación comarcaron con DCX o GFAP, otra cantidad considerable de ellas también fue positiva para IB4. Como ya hemos comentado, la proliferación celular es un fenómeno asociado al proceso de activación microglial (Graeber y cols. 1988). Además, la activación de la microglía también conlleva una transformación que implica el cambio de la forma ramificada (Figura 47) hacia una morfología similar a la de los macrófagos (Vilhardt. 2005). Esta transformación morfológica también fue observada en nuestros experimentos de infusión ICV. Bajo las condiciones experimentales de este estudio, la inserción de la cánula en el ventrículo lateral podría haber sido parcialmente responsable de la activación de la microglía, pero no se hallaron células IB4+ en los ventrículos laterales de los animales con infusión ICV de vehículo. Por otra parte, ya que en este modelo experimental de EP no se altera el cerebro a nivel del tercer ventrículo, la presencia de microglía proliferante con morfología redondeada entorno a esta estructura tras la infusión en el ventrículo lateral de LGF sugiere la capacidad de este factor para activar a este tipo celular.

Los resultados mostrados en este trabajo relacionan la administración IS, ICV e IP de LGF con la respuesta de activación por parte de la microglia. Este hecho sugiere que este fenotipo probablemente sea la principal diana celular del LGF en el cerebro, pero no

se puede excluir el posible papel de otros tipos celulares como la astroglia y las células endoteliales que también responden a la acción de este factor.

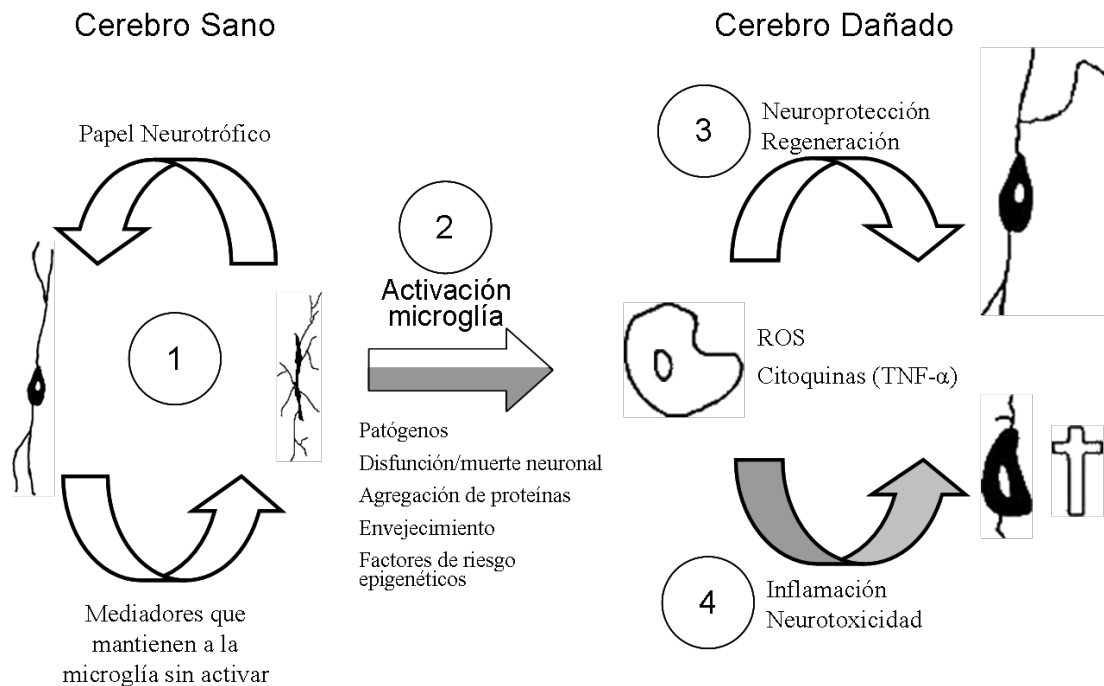


Figura 47. (1) En el cerebro sano, la microglía se encarga de mantener la homeostasis neuronal y a su vez recibe información por parte de las neuronas y de las células gliales para permanecer inactivada. (2) La microglía pasa a un estado de activación en respuesta a un amplio rango de estímulos nocivos. La activación de la microglía puede ser beneficiosa (3) cuando las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las citoquinas que se secretan se mantienen en niveles bajos o transitorios. Sin embargo, cuando se sobrepasan ciertos niveles de tolerancia (4), estos mecanismos se convierten en fenómenos neurotóxicos que dan paso a la disfunción y muerte neuronal, eventos que a su vez pueden contribuir en el mantenimiento de esta activación de la microglía. Modificado de (Vilhardt. 2005).

3.2 Efectos del LGF sobre los astrocitos y las células endoteliales.

Los astrocitos juegan un papel clave controlando los múltiples pasos de la neurogénesis en el adulto (Ma y cols. 2005; Mori y cols. 2005; Barkho y cols. 2006). Por otro lado, la migración de los neuroblastos en los roedores se produce en asociación con la astroglia reactiva y los vasos sanguíneos (Teramoto y cols. 2003; Ohab y cols. 2006; Thored y cols. 2006; Yamashita y cols. 2006; Bovetti y cols. 2007). La mayoría de las células DCX+ con morfología de neuroblastos en migración, que fueron halladas en el estriado de los animales infundidos ICV con LGF, no estaban asociadas a vasos sanguíneos. Sin embargo, estos neuroblastos fueron localizados sobre un lecho de

astrocitos, que debido a la infusión de LGF, proliferaron y mostraron hipertrofia del cuerpo celular, dos características distintivas de la reactividad glial. La asociación de los astrocitos con los neuroblastos en migración ha sido observada cuando los neuroblastos migran hacia el tejido estriatal dañado (Thored y cols. 2006; Yamashita y cols. 2006). Dado que el estriado denervado es un tejido dañado, los resultados de infusión ICV sugieren que los astrocitos reactivos podrían estar implicados en la migración neuronal observada en este modelo experimental de EP. Los astrocitos reactivos también podrían participar en la neurorregeneración promovida por el factor, ya que la administración IP de LGF incrementó la expresión de la proteína GFAP y fomentó la hipertrofia del cuerpo celular de las células GFAP+ halladas en el estriado. Ambos eventos son característicos de la astrogía reactiva la cual es capaz de sintetizar y liberar factores tróficos (Shen y cols. 2010; Barreto y cols. 2011; Yan y cols. 2011).

Además de la microglía y los astrocitos, otros tipos celulares podrían mediar en la generación de nuevas neuronas inducida por la acción del LGF en las ratas lesionadas con 6-OHDA. Las células endoteliales de la vena porta son la diana principal del LGF en el hígado (Díaz-Gil y cols. 2003). Estas células estimulan la autorrenovación de las CMN, así como la diferenciación neuronal de los progenitores neurales mediante la producción de factores solubles y el contacto directo (Palmer y cols. 2000; Jin y cols. 2002; Doetsch. 2003; Shen y cols. 2004; Li y cols. 2006; Gama Sosa y cols. 2007; Guo y cols. 2008; Teng y cols. 2008). En el estriado de los animales con infusión ICV de LGF, aproximadamente el 20% de las células BrdU+ fueron localizadas próximas a los vasos sanguíneos y aproximadamente el 5% de estas células mostraron morfología de célula endotelial. Estos resultados sugieren la posibilidad de que el LGF pudiera estimular a las células endoteliales, y que éstas a su vez liberen algún tipo de factores implicados en la neurogénesis.

Los resultados de la administración IS, ICV e IP de LGF muestran que este factor tiene actividad neurogénica y neurorregenerativa y capacidad para promover la activación de la microglía en el parénquima estriatal de las ratas lesionadas con 6-OHDA. La infusión IS de LGF no afectó al número de neuronas y de células microgliales que derivaron de las CMN implantadas. Sin embargo, el LGF incrementó el número de células BrdU+ que mostraron morfología endotelial. Además, está descrito que LGF estimula la expresión del factor de necrosis tumoral en el hígado (Díaz-Gil y cols. 2003) y que esta citoquina juega

un papel relevante a la hora de estimular la angiogénesis (Otrock y cols. 2007; Sainson y cols. 2008). De este modo, podemos sugerir que el TNF- α podría ser responsable del incremento en el número de células BrdU+ que mostraron morfología similar a la de las células endoteliales, tal y como se observó en los animales con implantes de CMN e infusión IS de LGF.

3.3 Papel del TNF- α en la acción del LGF.

Durante el estudio de los efectos de la administración de LGF hemos constatado que una única inyección intraperitoneal de este factor estimula la inmunorreactividad y la expresión transitoria de TNF- α en el estriado lesionado de las ratas hemiparkinsonianas. La microglía activada es capaz de sintetizar y liberar TNF- α (Wang y cols. 2003; Suzuki y cols. 2004) (Figura 47). Debido a que las células positivas para TNF- α halladas en el parénquima estriatal coexpresaron OX6 y mostraron morfología de células de microglía, podemos pensar que tras la estimulación directa con LGF, estas células son capaces de sintetizar esta citoquina. De hecho, el LGF estimula la síntesis de TNF- α en monocitos humanos (Díaz-Gil, comunicación personal), y la microglía se origina a partir de los monocitos que invaden el SNC durante el desarrollo (Ling y Wong. 1993). La actividad del LGF en el hígado está mediada por la regulación al alza de la expresión de TNF- α y de su ARNm (Díaz-Gil y cols. 2003). De manera similar, el TNF- α producido de manera transitoria por la microglía activada tras la administración puntual del LGF, podría ser el responsable del efecto neuroprotector y/o neuroregenerador observado en las neuronas y los terminales dopaminérgicos de los animales que recibieron el tratamiento IS e IP con el factor. Además, está descrito que la liberación transitoria y a corto plazo de TNF- α tiene un efecto neuroprotector siempre y cuando no esté inducida de manera crónica (Figura 47), ya que en este caso el efecto observado es de carácter neurodegenerativo (Gemma y cols. 2007). Otros estudios también indican el posible papel de la señalización ejercida por el TNF- α en la neuroprotección (Figiel. 2008; Kraft y cols. 2009; Bartsch y cols. 2010; Chertoff y cols. 2011; Mitchell y cols. 2011) y en el crecimiento de las neuritas (Schmitt y cols. 2010). En relación con estos estudios, se ha propuesto que el TNF- α liberado por la microglía es capaz de promover la supervivencia neuronal mediante la inducción de la expresión de neurotrofinas y proteínas antiapoptóticas en neuronas y astrocitos (Figiel. 2008). Además, dado que la microglía activada es capaz de sintetizar y liberar TNF- α y que esta citoquina está implicada en los fenómenos de proliferación, migración y

diferenciación de los precursores neurales (Wu y cols. 2000; Ben-Hur y cols. 2003; Katakowski y cols. 2007), se puede argumentar que el TNF- α podría ser un efector molecular que participa en la neurogénesis inducida por la administración ICV de LGF observada en este modelo experimental de EP. Por otro lado, existe un estudio que sugiere que la liberación de TNF- α por parte de la microglía activada, estimula la síntesis de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) en células de astrocitoma (Widera y cols. 2004), cuyo papel es crítico en la migración de los neuroblastos tras la isquemia cerebral focal (Yan y cols. 2007). Por último, también hay que mencionar la capacidad de los precursores neurales a la hora de sintetizar citoquinas como el TNF- α , cuyo papel en este caso está más asociado a la regulación funcional y a la neuroreparación del microambiente que les rodea, que a la inducción y control de la neuroinflamación (Klassen y cols. 2003).

Los resultados de la administración IP de LGF de manera crónica también sugieren que el factor ejerció un papel anti-inflamatorio frente a los efectos de la neurotoxicidad inducida por la 6-OHDA. De este modo, la administración IP crónica de LGF redujo a largo plazo los niveles de TNF- α en el estriado lesionado y la expresión de OX6 en el mesencéfalo ipsilateral a la lesión. Estos resultados están en concordancia con otros estudios en los que se ha observado una reducción de la activación de la microglía y de la expresión de TNF- α por la acción de varias sustancias como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Delgado y Ganea. 2003), el resveratrol (Jin y cols. 2008), el antidepresivo paroxetina (Chung y cols. 2010), el fármaco antidiabético rosiglitazona (Carta y cols. 2011) y de la dieta cetogénica (Yang y Cheng. 2010) en modelos experimentales de EP.

4. EFECTOS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR Y POSIBLES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA ACCIÓN DEL LGF.

4.1 LGF y supervivencia celular.

La proteína Bcl-2 está implicada en el bloqueo de la muerte celular programada. El papel anti-apoptótico de esta proteína en la EP está relacionado con la prevención de la degeneración de las neuronas de la SNpc, el aumento de la expresión de TH y la mejoría en la conducta rotacional observada en ratas lesionadas con 6-OHDA (Natsume y cols. 2001; Fink y cols. 2003). Bcl-2 también está asociado con la protección frente a la toxicidad inducida por dopamina en las neuronas dopaminérgicas y en cultivos de neuroblastoma y neuronas del cerebelo (Ziv y cols. 1997; Offen y cols. 2001). Además, está descrito que esta proteína desempeña un papel regulador en la viabilidad de las CMN (Frebel y Wiese. 2006; Lee y cols. 2009). Por el contrario, Bax es una proteína pro-apoptótica que está implicada en la inducción de la degeneración y la muerte neuronal. Esta proteína participa activamente en los mecanismos que desencadenan la apoptosis inducida por 6-OHDA en cultivos neuronales (Gómez-Lázaro y cols. 2008) y en los terminales y neuronas dopaminérgicas de las ratas hemiparkinsonianas (Mladenovic y cols. 2004; Li y cols. 2012). Nuestros resultados muestran que la expresión estriatal de Bcl-2 fue estimulada tras la administración IS de LGF y que la administración IP de LGF también incrementó de manera significativa la expresión de esta proteína en el estriado y en la SN de las ratas hemiparkinsonianas. Además, ya que la administración del factor no afectó a los niveles de expresión de la proteína anti-apoptótica Bax, podemos sugerir que el LGF probablemente pudo activar los mecanismos que regulan la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas y de las CMNs implantadas a través de la estimulación de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Por último, hay que añadir que también se estudiaron otras proteínas como AKT cuya activación está implicada en la supervivencia neuronal (Noshita y cols. 2001; Zhao y cols. 2006), pero los resultados obtenidos no fueron concluyentes.

4.2 Vías de señalización implicadas en la acción del LGF.

Hasta el estudio de los efectos de la administración IP de LGF no se tenía información sobre las posibles vías de transducción de señal implicadas en las acciones del factor. La interacción de muchos factores de crecimiento con sus respectivos receptores estimula a la vía de señalización mediada por MAPK/ERK que está implicada en los fenómenos de neuroprotección y neuroregeneración (Zhu y cols. 2006; He y cols. 2008). La administración IP de una única dosis de LGF provoca el incremento de la fosforilación de ERK1/2 en el estriado lesionado de las ratas hemiparkinsonianas. Debido a que este efecto fue observado 24 horas después del tratamiento con LGF, es difícil determinar si éste es debido a una acción indirecta o directa del factor. En relación con esta última posibilidad, existen estudios que muestran la capacidad de la albúmina y de la bilirrubina (el LGF es un complejo albúmina-bilirrubina) a la hora de activar la vía de señalización ERK1/2 en la microglía y en los astrocitos (Hung y cols. 2010; Ralay Ranaivo y Wainwright. 2010). Además, nuestros estudios preliminares *in vitro* indican que el LGF activa esta vía de señalización en las células gliales (Gonzalo-Gobernado y cols. 2011), así que podemos sugerir que la activación de ERK1/2 puede ser debida a una acción directa del LGF sobre estas células. Sin embargo, no se puede excluir la implicación del TNF- α u otros factores como el BDNF y el NGF, cuya síntesis y liberación pudiera estar mediada por el LGF, ya que estos agentes también son capaces de estimular la vía de señalización ERK1/2 en las células neurales (Milligan y cols. 1998; Arthur y cols. 2004; Lu y cols. 2010).

Debido a que la fosforilación de ERK1/2 desempeña un papel importante en la regulación de la supervivencia neuronal (Cavanaugh y cols. 2006; Zigmond. 2006), podemos sugerir que la vía de señalización mediada por ERK1/2 podría estar implicada parcialmente en la actividad neuroprotectora del LGF observada en los animales hemiparkinsonianos. Además, hay que comentar que los niveles de expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 estaban regulados a alza en el estriado y en el mesencéfalo de las ratas lesionadas con 6-OHDA y está descrito que la expresión de esta proteína está regulada por la vía de señalización mediada por ERK1/2 (Boucher y cols. 2000; Creson y cols. 2009).

La administración IP de LGF también fomentó la fosforilación del factor de transcripción CREB en el estriado. Esta proteína está implicada en la supervivencia de las células neurales (Lin y cols. 2008; Barneda-Zahonero y cols. 2009; Lee y cols. 2010; Herold y cols. 2011) y en la protección y la regeneración de los axones (Teng y Tang. 2006; Hannila y Filbin. 2008; Fujino y cols. 2009). CREB también regula la expresión de las enzimas encargadas de la biosíntesis de catecolaminas y de los transportadores de estas moléculas (Lim y cols. 2000; Watson y cols. 2001; Lewis-Tuffin y cols. 2004). Además, este factor de transcripción está relacionado con la prevención de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, la mejoría de la conducta rotacional y la recuperación de los niveles de catecolaminas estriatales en ratones lesionados con 6-OHDA (Weng y cols. 2007). Por estos motivos, la activación de CREB podría estar implicada en el aumento de expresión de TH y DAT, en el efecto sobre los terminales estriatales y las neuronas dopaminérgicas observados en el estriado y la SN de las ratas hemiparkinsonianas que recibieron la administración IP de LGF. Por otro lado, está descrito que Bcl-2 es una diana transcripcional de la vía de señalización mediada por las MAPKs (Liu y cols. 1999) y que la actividad de CREB está ligada a la expresión de Bcl-2 y a la supervivencia celular inducida por factores tróficos como las neurotrofinas (Riccio y cols. 1999), poniendo de manifiesto la existencia de un mecanismo de supervivencia mediado por MAPK-CREB-Bcl-2 (Kaplan y Miller. 2000). Esta vía pudo ser activada por el tratamiento con LGF en nuestro modelo experimental. Sin embargo, no se puede determinar, a partir de los resultados de la administración IP de LGF, si la fosforilación de CREB estuvo mediada por la vía de señalización MAPK/ERK ya que esta vía fue activada 24 horas después de la administración del factor y los niveles máximos de fosfo-CREB fueron observados 72 horas después del inicio del tratamiento. Por otro lado, nuestros estudios *in vitro* muestran que el LGF estimula la fosforilación de ERK1/2 y CREB en la glía (Gonzalo-Gobernado y cols. 2011), lo que indica que la señalización por MAPK/ERK está implicada en la activación de CREB en estas células. De todos modos, es necesario realizar experimentos adicionales para determinar si existe fosforilación de CREB en las neuronas y si la vía de señalización mediada por MAPK/ERK desempeña un papel importante en la fosforilación de CREB ejercida por el LGF.

Tomados en conjunto, estos resultados ponen de manifiesto que tanto la activación de la vía de señalización celular mediada por MAPK/ERK y su relación con la expresión de Bcl-2 como la fosforilación del factor de transcripción CREB, pueden formar parte de los principales mecanismos que desencadenan la acción neuroprotectora y neuroreparadora del LGF en este modelo experimental de enfermedad de Parkinson.

4.3 Posibles mecanismos de acceso del LGF al SNC.

Los resultados de administración IP podrían sugerir la capacidad del LGF para atravesar la barrera hematoencefálica de los animales lesionados con 6-OHDA. Basándonos en nuestros datos experimentales no podemos definir el mecanismo implicado en este transporte, pero existen varios estudios en los que se demuestra que la transcitosis mediada por caveolas es un proceso activo que media en el transporte transendotelial de albúmina y de nutrientes conjugados con albúmina (Predescu y cols. 2004; Mehta y Malik. 2006), y el LGF es un complejo albúmina-bilirrubina. Por otro lado, el acceso del LGF al SNC pudo ser mediado a través de los receptores para productos finales de glucosilación avanzada (RAGE) localizados en el endotelio, de modo similar a lo descrito recientemente para la proteína β -Amiloide (Sagare y cols. 2011). De este modo, se puede considerar a los productos AGE como moléculas estructuralmente equiparables al LGF dado que son proteínas, la mayoría albúmina, unidas a glucosa lo que fomenta el cambio de conformación de la albúmina (Thornalley. 1998). Además, los receptores RAGE están presentes en los astrocitos y la microglía (Park y cols. 2004), y su estimulación fomenta la liberación de TNF- α por parte de estas células (Wang y cols. 2002).

En resumen, los resultados de este trabajo muestran que la administración de LGF fomenta la neurogénesis y la supervivencia celular, promueve la migración de las nuevas neuronas generadas, estimula el crecimiento de los terminales TH+ en el estriado lesionado, incrementa los niveles de DA estriatales y protege parcialmente de la neurotoxicidad inducida por la 6-OHDA a las neuronas dopaminérgicas de la SN de los animales hemiparkinsonianos. Además, el LGF provoca la supervivencia de las CMN implantadas en el estriado carente de dopamina, reduce la conducta rotacional inducida por apomorfina y mejora la coordinación motora en este modelo experimental de EP. Estos

Discusión

efectos pueden estar mediados por la activación de la microglía. Por último, la actividad del LGF podría estar mediada por la estimulación de las vías de señalización MAPK/ERK y por la regulación de proteínas críticas para la supervivencia celular como son Bcl-2 y P-CREB.

VIII.-CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El LGF es un agente con propiedades proliferativas y neurogénicas ya que tiene la capacidad de estimular la división de los precursores neurales de la ZSV, la migración de los neuroblastos y la generación de nuevas neuronas en el estriado dañado de las ratas lesionadas con 6-OHDA.
2. La administración IS e IP de LGF mejora la función motora de los animales hemiparkinsonianos y la homeostasis del sistema dopaminérgico dañado puesto que el factor propicia la reinervación de los terminales dopaminérgicos, incrementa los niveles de DA estriatales y protege parcialmente de la neurotoxicidad inducida por la 6-OHDA a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra.
3. Los efectos neuroprotectores y neuroregenerativos del LGF en ratas hemiparkinsonianas están asociados con una mejora de la conducta rotacional inducida por apomorfina y de la coordinación motora.
4. Los implantes de CMN sobreviven, migran y mantienen su capacidad para diferenciarse hacia fenotipos específicos del SNC y otros fenotipos no neurales, en el estriado carente de dopamina de las ratas lesionadas con 6-OHDA. La co-administración intracerebral de LGF fomenta la supervivencia de las CMNs implantadas y promueve una mejora significativa de la conducta rotacional en este modelo de Parkinson experimental.
5. La microglía es la principal diana celular del LGF en el cerebro, aunque no se puede excluir el posible papel de la astrogliá y de las células endoteliales, ya que también responden a la acción de este factor.
6. La actividad del LGF está probablemente mediada por la estimulación de la vía de señalización MAPK/ERK1/2 y por la regulación de proteínas críticas para la supervivencia celular como son Bcl-2 y fosfo-CREB.

Conclusiones

En conclusión, los resultados de este trabajo ponen de manifiesto el potencial neuroregenerador y neuroprotector del LGF sobre el sistema dopaminérgico dañado, y su capacidad para estimular la neurogénesis y la supervivencia de los implantes de CMN en el estriado carente de DA. Considerando que la administración del factor también reduce significativamente el déficit motor en las ratas lesionadas con 6-OHDA, podemos proponer al LGF como un posible factor novel de utilidad en el tratamiento de la EP.

IX.-BIBLIOGRAFÍA

- Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL & Persson MA. (2003). Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15983-15988.
- Abakumova O, Fedorova LM, Popov AA, Li VS, Arkhangelskaya SL & Bachmanova GI. (1994). Effects of albumin-bilirubin complexes with syngeneic or allogeneic albumin on DNA and protein synthesis in liver and spleen of partially hepatectomized rats. *J Hepatol* **21**, 947-952.
- Adams JD, Jr., Klaidman LK & Leung AC. (1993). MPP⁺ and MPDP⁺ induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. *Free Radic Biol Med* **15**, 181-186.
- Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Alvarez de la Rosa D, Abreu P, Giraldez T, Castro-Hernandez J, Salas-Hernandez J, Lanciego JL, Rodriguez M & Gonzalez-Hernandez T. (2009). Dopamine transporter glycosylation correlates with the vulnerability of midbrain dopaminergic cells in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **36**, 494-508.
- Ahmed S. (2009). The culture of neural stem cells. *J Cell Biochem* **106**, 1-6.
- Airaksinen MS & Saarma M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* **3**, 383-394.
- Akerud P, Canals JM, Snyder EY & Arenas E. (2001). Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **21**, 8108-8118.
- Albin RL, Young AB & Penney JB. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* **12**, 366-375.
- Altar CA, Boylan CB, Jackson C, Hershenov S, Miller J, Wiegand SJ, Lindsay RM & Hyman C. (1992). Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11347-11351.
- Alvarez-Buylla A & Lim DA. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**, 683-686.
- Arias-Carrion O, Olivares-Bunuelos T & Drucker-Colin R. (2007). Neurogénesis en el cerebro adulto. *Rev Neurol* **44**, 541-550.
- Arias-Carrion O & Yuan TF. (2009). Autologous neural stem cell transplantation: a new treatment option for Parkinson's disease? *Med Hypotheses* **73**, 757-759.
- Aron L & Klein R. (2011). Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. *Trends Neurosci* **34**, 88-100.
- Arthur JS, Fong AL, Dwyer JM, Davare M, Reese E, Obrietan K & Impey S. (2004). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J Neurosci* **24**, 4324-4332.
- Azadi S, Johnson LE, Paquet-Durand F, Perez MT, Zhang Y, Ekstrom PA & van Veen T. (2007). CNTF+BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina. *Brain Res* **1129**, 116-129.
- Backman CM, Shan L, Zhang YJ, Hoffer BJ, Leonard S, Troncoso JC, Vonsattel P & Tomac AC. (2006). Gene expression patterns for GDNF and its receptors in the human putamen affected by Parkinson's disease: a real-time PCR study. *Mol Cell Endocrinol* **252**, 160-166.
- Baier PC, Schindehutte J, Thinyane K, Flugge G, Fuchs E, Mansouri A, Paulus W, Gruss P & Trenkwalder C. (2004). Behavioral changes in unilaterally 6-hydroxy-dopamine lesioned rats after transplantation of differentiated mouse embryonic stem cells without morphological integration. *Stem Cells* **22**, 396-404.

- Barami K. (2008). Relationship of neural stem cells with their vascular niche: implications in the malignant progression of gliomas. *J Clin Neurosci* **15**, 1193-1197.
- Barde YA, Edgar D & Thoenen H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* **1**, 549-553.
- Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH & Zhao X. (2006). Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev* **15**, 407-421.
- Barneda-Zahonero B, Minano-Molina A, Badiola N, Fado R, Xifro X, Saura CA & Rodriguez-Alvarez J. (2009). Bone morphogenetic protein-6 promotes cerebellar granule neurons survival by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. *Mol Biol Cell* **20**, 5051-5063.
- Barreto GE, Gonzalez J, Torres Y & Morales L. (2011). Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res* **71**, 107-113.
- Bartsch JW, Wildeboer D, Koller G, Naus S, Rittger A, Moss ML, Minai Y & Jockusch H. (2010). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) regulates shedding of TNF-alpha receptor 1 by the metalloprotease-disintegrin ADAM8: evidence for a protease-regulated feedback loop in neuroprotection. *J Neurosci* **30**, 12210-12218.
- Batchelor PE & Howells DW. (2003). CNS regeneration: clinical possibility or basic science fantasy? *J Clin Neurosci* **10**, 523-534.
- Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA & Howells DW. (1999). Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* **19**, 1708-1716.
- Batchelor PE, Porritt MJ, Martinello P, Parish CL, Liberatore GT, Donnan GA & Howells DW. (2002). Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. *Mol Cell Neurosci* **21**, 436-453.
- Bazan E, Alonso FJ, Redondo C, Lopez-Toledano MA, Alfaro JM, Reimers D, Herranz AS, Paino CL, Serrano AB, Cobacho N, Caso E & Lobo MV. (2004). In vitro and in vivo characterization of neural stem cells. *Histol Histopathol* **19**, 1261-1275.
- Beal MF. (2001). Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* **2**, 325-334.
- Behrstock S, Ebert A, McHugh J, Vosberg S, Moore J, Schneider B, Capowski E, Hei D, Kordower J, Aebischer P & Svendsen CN. (2006). Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates. *Gene Ther* **13**, 379-388.
- Beitner-Johnson D, Rust RT, Hsieh T & Millhorn DE. (2000). Regulation of CREB by moderate hypoxia in PC12 cells. *Adv Exp Med Biol* **475**, 143-152.
- Ben-Hur T, Ben-Menachem O, Furer V, Einstein O, Mizrachi-Kol R & Grigoriadis N. (2003). Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci* **24**, 623-631.
- Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D & Goldman SA. (2001). Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* **21**, 6718-6731.
- Bensadoun JC, Deglon N, Tseng JL, Ridet JL, Zurn AD & Aebischer P. (2000). Lentiviral vectors as a gene delivery system in the mouse midbrain: cellular and behavioral improvements in a 6-OHDA model of Parkinson's disease using GDNF. *Exp Neurol* **164**, 15-24.

- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV & Greenamyre JT. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* **3**, 1301-1306.
- Bilang-Bleuel A, Revah F, Colin P, Locquet I, Robert JJ, Mallet J & Horellou P. (1997). Intrastriatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8818-8823.
- Bjorklund A & Lindvall O. (2000). Parkinson disease gene therapy moves toward the clinic. *Nat Med* **6**, 1207-1208.
- Bjorklund A, Rosenblad C, Winkler C & Kirik D. (1997). Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **4**, 186-200.
- Bjugstad KB, Teng YD, Redmond DE, Jr., Elsworth JD, Roth RH, Cornelius SK, Snyder EY & Sladek JR, Jr. (2008). Human neural stem cells migrate along the nigrostriatal pathway in a primate model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **211**, 362-369.
- Blandini F, Armentero MT & Martignoni E. (2008). The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord* **14 Suppl 2**, S124-129.
- Bloem BR, Irwin I, Buruma OJ, Haan J, Roos RA, Tetrad JW & Langston JW. (1990). The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **97**, 273-293.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA & Heutink P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* **299**, 256-259.
- Bonni A, Ginty DD, Dudek H & Greenberg ME. (1995). Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Mol Cell Neurosci* **6**, 168-183.
- Borta A & Hoglinger GU. (2007). Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem* **100**, 587-595.
- Boucher MJ, Morisset J, Vachon PH, Reed JC, Laine J & Rivard N. (2000). MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem* **79**, 355-369.
- Bovetti S, Hsieh YC, Bovolin P, Perroteau I, Kazunori T & Puche AC. (2007). Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* **27**, 5976-5980.
- Boya J, Calvo JL, Carbonell AL & Borregon A. (1991). A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J Anat* **175**, 229-236.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN & Braak E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **24**, 197-211.
- Brederlau A, Correia AS, Anisimov SV, Elmi M, Paul G, Roybon L, Morizane A, Bergquist F, Riebe I, Nannmark U, Carta M, Hanse E, Takahashi J, Sasai Y, Funa K, Brundin P, Eriksson PS & Li JY. (2006). Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells* **24**, 1433-1440.
- Bucher NL & Malt R. (1971). Regeneration of Liver and Kidney. pp. 79-113. Little Brown and Co Boston.

- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G & Schwartz M. (2006). Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* **31**, 149-160.
- Calatrava-Ferreras L, Gonzalo-Gobernado R, Herranz AS, Reimers D, Asensio MJ, Miranda C & Bazán E. (2012). Role of Growth Factor Receptors in Neural Stem Cells Differentiation and Dopaminergic Neurons Generation. In *Neural Stem Cells and Therapy*, ed. Sun T. InTech.
- Carlsson A & Lindqvist M. (1973). Effect of ethanol on the hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat brain in vivo. *J Pharm Pharmacol* **25**, 437-440.
- Carpenter MK, Winkler C, Fricker R, Emerich DF, Wong SC, Greco C, Chen EY, Chu Y, Kordower JH, Messing A, Bjorklund A & Hammang JP. (1997). Generation and transplantation of EGF-responsive neural stem cells derived from GFAP-hNGF transgenic mice. *Exp Neurol* **148**, 187-204.
- Carta AR, Frau L, Pisanu A, Wardas J, Spiga S & Carboni E. (2011). Rosiglitazone decreases peroxisome proliferator receptor-gamma levels in microglia and inhibits TNF-alpha production: new evidences on neuroprotection in a progressive Parkinson's disease model. *Neuroscience* **194**, 250-261.
- Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CE, Pitzer MR, McGuire SO, Storch A & Collier TJ. (2001). A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp Neurol* **171**, 98-108.
- Cavanaugh JE, Jaumotte JD, Lakoski JM & Zigmond MJ. (2006). Neuroprotective role of ERK1/2 and ERK5 in a dopaminergic cell line under basal conditions and in response to oxidative stress. *J Neurosci Res* **84**, 1367-1375.
- Cohen AD, Zigmond MJ & Smith AD. (2011). Effects of intrastriatal GDNF on the response of dopamine neurons to 6-hydroxydopamine: time course of protection and neurorestoration. *Brain Res* **1370**, 80-88.
- Conde MV, Gonzalez MC, Quintana-Villamandos B, Abderrahim F, Briones AM, Condezo-Hoyos L, Regadera J, Susin C, Gomez de Diego JJ, Delgado-Baeza E, Diaz-Gil JJ & Arribas SM. (2011). Liver growth factor treatment restores cell-extracellular matrix balance in resistance arteries and improves left ventricular hypertrophy in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H1153-1165.
- Condezo-Hoyos L, Abderrahim F, Conde MV, Susin C, Diaz-Gil JJ, Gonzalez MC & Arribas SM. (2009). Antioxidant activity of liver growth factor, a bilirubin covalently bound to albumin. *Free Radic Biol Med* **46**, 656-662.
- Condezo-Hoyos L, Arribas SM, Abderrahim F, Somoza B, Gil-Ortega M, Diaz-Gil JJ, Conde MV, Susin C & Gonzalez MC. (2012). Liver growth factor treatment reverses vascular and plasmatic oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **30**, 1185-1194.
- Cooper O & Isacson O. (2004). Intrastriatal transforming growth factor alpha delivery to a model of Parkinson's disease induces proliferation and migration of endogenous adult neural progenitor cells without differentiation into dopaminergic neurons. *J Neurosci* **24**, 8924-8931.
- Cotzias GC, Van Woert MH & Schiffer LM. (1967). Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med* **276**, 374-379.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG & Aigner L. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* **21**, 1-14.

- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S & van der Kooy D. (1996). In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* **16**, 2649-2658.
- Creedon DJ, Tansey MG, Baloh RH, Osborne PA, Lampe PA, Fahrner TJ, Heuckeroth RO, Milbrandt J & Johnson EM, Jr. (1997). Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7018-7023.
- Creson TK, Yuan P, Manji HK & Chen G. (2009). Evidence for involvement of ERK, PI3K, and RSK in induction of Bcl-2 by valproate. *J Mol Neurosci* **37**, 123-134.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelsø C, Holtas S, van Roon-Mom WM, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RL & Eriksson PS. (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* **315**, 1243-1249.
- Chen Y, Ai Y, Slevin JR, Maley BE & Gash DM. (2005). Progenitor proliferation in the adult hippocampus and substantia nigra induced by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol* **196**, 87-95.
- Chertoff M, Di Paolo N, Schoeneberg A, Depino A, Ferrari C, Wurst W, Pfizenmaier K, Eisel U & Pitossi F. (2011). Neuroprotective and neurodegenerative effects of the chronic expression of tumor necrosis factor alpha in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice. *Exp Neurol* **227**, 237-251.
- Chung YC, Kim SR & Jin BK. (2010). Paroxetine prevents loss of nigrostriatal dopaminergic neurons by inhibiting brain inflammation and oxidative stress in an experimental model of Parkinson's disease. *J Immunol* **185**, 1230-1237.
- Date I, Shingo T, Yoshida H, Fujiwara K, Kobayashi K, Takeuchi A & Ohmoto T. (2001). Grafting of encapsulated genetically modified cells secreting GDNF into the striatum of parkinsonian model rats. *Cell Transplant* **10**, 397-401.
- Date I & Yasuhara T. (2009). Neurological disorders and neural regeneration, with special reference to Parkinson's disease and cerebral ischemia. *J Artif Organs* **12**, 11-16.
- de Chevigny A, Cooper O, Vinuela A, Reske-Nielsen C, Lagace DC, Eisch AJ & Isacson O. (2008). Fate mapping and lineage analyses demonstrate the production of a large number of striatal neuroblasts after transforming growth factor alpha and noggin striatal infusions into the dopamine-depleted striatum. *Stem Cells* **26**, 2349-2360.
- de Lau LM & Breteler MM. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* **5**, 525-535.
- Del Zompo M, Piccardi MP, Ruiu S, Quartu M, Gessa GL & Vaccari A. (1993). Selective MPP⁺ uptake into synaptic dopamine vesicles: possible involvement in MPTP neurotoxicity. *Br J Pharmacol* **109**, 411-414.
- Delgado M & Ganea D. (2003). Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *FASEB J* **17**, 944-946.
- Deumens R, Blokland A & Prickaerts J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* **175**, 303-317.
- Dev KK, Hofele K, Barbieri S, Buchman VL & van der Putten H. (2003). Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* **45**, 14-44.
- Díaz-Gil JJ, Escartin P, Garcia-Canero R, Trilla C, Veloso JJ, Sanchez G, Moreno-Caparrós A, Enrique de Salamanca C, Lozano R, Gavilanes JG & et al. (1986a). Purification of a liver DNA-synthesis promoter from plasma of partially hepatectomized rats. *Biochem J* **235**, 49-55.

- Díaz-Gil JJ, García-Cañero R, de Foronda M, Pérez de Diego J, Cereceda RM, Trilla C, Rúa C, Machín C, Herrero N & Escartin P. (1992). Purification and characterization of the Liver Growth Factor from Pig serum. *Hepatology* **16**, 499.
- Díaz-Gil JJ, García-Monzon C, Rúa C, Martín-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, Machín C, Fernández-Martínez A & García-Canero R. (2008). The anti-fibrotic effect of liver growth factor is associated with decreased intrahepatic levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 and transforming growth factor beta 1 in bile duct-ligated rats. *Histol Histopathol* **23**, 583-591.
- Díaz-Gil JJ, García-Monzon C, Rúa C, Martín-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, Machín C, Fernández-Martínez A & García-Canero R. (2009). Liver growth factor antifibrotic activity in vivo is associated with a decrease in activation of hepatic stellate cells. *Histol Histopathol* **24**, 473-479.
- Díaz-Gil JJ, Gavilanes JG, García-Canero R, García-Segura JM, Santamaría L, Trilla C, Martín AM, Guerra MA, García-Escandón F, Iniguez JA & et al. (1989). Liver growth factor purified from human plasma is an albumin-bilirubin complex. *Mol Biol Med* **6**, 197-207.
- Díaz-Gil JJ, Gavilanes JG, Sánchez G, García-Canero R, García-Segura JM, Santamaría L, Trilla C & Escartin P. (1987a). Identification of a liver growth factor as an albumin-bilirubin complex. *Biochem J* **243**, 443-448.
- Díaz-Gil JJ, Majano PL, López-Cabrera M, Sánchez-López V, Rúa C, Machín C, Trilla C, García-Canero R & Moreno-Otero R. (2003). The mitogenic activity of the liver growth factor is mediated by tumor necrosis factor alpha in rat liver. *J Hepatol* **38**, 598-604.
- Díaz-Gil JJ, Muñoz J, Albillos A, Rúa C, Machín C, García-Canero R, Cereceda RM, Guijarro MC, Trilla C & Escartin P. (1999). Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl₄-cirrhotic rats after injection of the Liver Growth Factor. *J Hepatol* **30**, 1065-1072.
- Díaz-Gil JJ, Rúa C, Machín C, Cereceda RM, García-Canero R, de Foronda M, Pérez de Diego J, Trilla C & Escartin P. (1994). Hepatic growth induced by injection of the liver growth factor into normal rats. *Growth Regul* **4**, 113-122.
- Díaz-Gil JJ, Rúa C, Machín C, Cereceda RM & Guijarro MC. (1994b). Hepatic recovery of dimethylnitrosamine-cirrhotic rats after injection of the Liver growth factor. In *NATO ASI Series "Cell Biology"*, pp. 275-285. Springer Verlag Berlín.
- Díaz-Gil JJ, Sánchez G, Santamaría L, Trilla C, Esteban P & Escartin P. (1986b). Liver DNA synthesis promoter activity detected in human plasma from subjects with hepatitis. *Hepatology* **6**, 658-661.
- Díaz-Gil JJ, Sánchez G, Trilla C & Escartin P. (1988). Identification of biliprotein as a liver growth factor. *Hepatology* **8**, 484-486.
- Doetsch F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 543-550.
- Dong Z, Su L & Mino J. (2007). Effects of endothelial cells on renewal and differentiation of neural stem cells. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* **24**, 1184-1186.
- Englund U, Björklund A & Wictorin K. (2002a). Migration patterns and phenotypic differentiation of long-term expanded human neural progenitor cells after transplantation into the adult rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* **134**, 123-141.
- Englund U, Fricker-Gates RA, Lundberg C, Björklund A & Wictorin K. (2002b). Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain: extensive migration and differentiation with long-distance axonal projections. *Exp Neurol* **173**, 1-21.

- Ericson C, Georgievska B & Lundberg C. (2005). Ex vivo gene delivery of GDNF using primary astrocytes transduced with a lentiviral vector provides neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* **22**, 2755-2764.
- Eriksson C, Bjorklund A & Wictorin K. (2003). Neuronal differentiation following transplantation of expanded mouse neurosphere cultures derived from different embryonic forebrain regions. *Exp Neurol* **184**, 615-635.
- Ernst C & Christie BR. (2005). Nestin-expressing cells and their relationship to mitotically active cells in the subventricular zones of the adult rat. *Eur J Neurosci* **22**, 3059-3066.
- Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadhi M, Twardzik D, Patel S & Loughlin S. (2000). In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14686-14691.
- Fernandez-Espejo E. (2004). Pathogenesis of Parkinson's disease: prospects of neuroprotective and restorative therapies. *Mol Neurobiol* **29**, 15-30.
- Ferrara N, Gerber HP & LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**, 669-676.
- Figiel I. (2008). Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **68**, 526-534.
- Fink DJ, Glorioso J & Mata M. (2003). Therapeutic gene transfer with herpes-based vectors: studies in Parkinson's disease and motor nerve regeneration. *Exp Neurol* **184 Suppl 1**, S19-24.
- Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM & Greenberg ME. (1997). CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* **19**, 1031-1047.
- Fisher B, Szuch P, Levine M & Fisher ER. (1971). A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration. *Science* **171**, 575-577.
- Forno LS. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 259-272.
- Forno LS, Langston JW, DeLanney LE & Irwin I. (1988). An electron microscopic study of MPTP-induced inclusion bodies in an old monkey. *Brain Res* **448**, 150-157.
- Frebel K & Wiese S. (2006). Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochem Soc Trans* **34**, 1287-1290.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D & Fahn S. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* **344**, 710-719.
- Frim DM, Uhler TA, Galpern WR, Beal MF, Breakefield XO & Isacson O. (1994). Implanted fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5104-5108.
- Frye CA, Petralia SM, Rhodes ME & DeBold JF. (2010). 6-hydroxydopamine lesions enhance progesterone-facilitated lordosis of rats and hamsters, independent of effects on motor behavior. *Physiol Behav* **99**, 218-224.
- Fujino H, Kitaoka Y, Hayashi Y, Munemasa Y, Takeda H, Kumai T, Kobayashi S & Ueno S. (2009). Axonal protection by brain-derived neurotrophic factor associated with CREB phosphorylation in tumor necrosis factor-alpha-induced optic nerve degeneration. *Acta Neuropathol* **117**, 75-84.
- Gage FH. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-1438.

- Gama Sosa MA, De Gasperi R, Rocher AB, Perez GM, Simons K, Cruz DE, Hof PR & Elder GA. (2007). Interactions of primary neuroepithelial progenitor and brain endothelial cells: distinct effect on neural progenitor maintenance and differentiation by soluble factors and direct contact. *Cell Res* **17**, 619-626.
- Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ & Gerhardt GA. (1996). Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* **380**, 252-255.
- Gasmi M, Brandon EP, Herzog CD, Wilson A, Bishop KM, Hofer EK, Cunningham JJ, Printz MA, Kordower JH & Bartus RT. (2007). AAV2-mediated delivery of human neurturin to the rat nigrostriatal system: long-term efficacy and tolerability of CERE-120 for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **27**, 67-76.
- Gemma C, Catlow B, Cole M, Hudson C, Samec A, Shah N, Vila J, Bachstetter A & Bickford PC. (2007). Early inhibition of TNFalpha increases 6-hydroxydopamine-induced striatal degeneration. *Brain Res* **1147**, 240-247.
- Gerfen C & Wilson C. (1996). The basal ganglia. In *Handbook of Chemical Anatomy*.
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN & Heywood P. (2003). Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* **9**, 589-595.
- Goedert M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **2**, 492-501.
- Goldberg M, Strecker W, Feeny D & Ruhenstroth-Bauer G. (1980). Evidence for and characterization of a liver cell proliferation factor from blood plasma of partially hepatectomized rats. *Horm Metab Res* **12**, 94-96.
- Gómez-Lázaro M, Galindo MF, Concannon CG, Segura MF, Fernandez-Gomez FJ, Llecha N, Comella JX, Prehn JH & Jordan J. (2008). 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. *J Neurochem* **104**, 1599-1612.
- Gonzalo-Gobernado R, Calatrava L, Casarejos MJ, Reimers D, Herranz AS, Miranda C, Rodriguez-Serrano M, Diaz-Gil JJ & Bazan E. (2011). La glía como mediadora del efecto neurotrófico del factor de crecimiento de hígado (LGF) en las neuronas dopaminérgicas dañadas: estudios in Vitro. *XIV Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia*.
- Graeber MB, Streit WJ & Kreutzberg GW. (1988). The microglial cytoskeleton: vimentin is localized within activated cells in situ. *J Neurocytol* **17**, 573-580.
- Grondin R, Zhang Z, Ai Y, Ding F, Walton AA, Surgener SP, Gerhardt GA & Gash DM. (2008). Intraputamenal infusion of exogenous neurturin protein restores motor and dopaminergic function in the globus pallidus of MPTP-lesioned rhesus monkeys. *Cell Transplant* **17**, 373-381.
- Grondin R, Zhang Z, Yi A, Cass WA, Maswood N, Andersen AH, Elsberry DD, Klein MC, Gerhardt GA & Gash DM. (2002). Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys. *Brain* **125**, 2191-2201.
- Gross A, McDonnell JM & Korsmeyer SJ. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-1911.
- Guo Y, Shi D, Li W, Liang C, Wang H, Ye Z, Hu L, Wang HQ & Li Y. (2008). Proliferation and neurogenesis of neural stem cells enhanced by cerebral microvascular endothelial cells. *Microsurgery* **28**, 54-60.

- Haas SJ, Petrov S, Kronenberg G, Schmitt O & Wree A. (2008). Orthotopic transplantation of immortalized mesencephalic progenitors (CSM14.1 cells) into the substantia nigra of hemiparkinsonian rats induces neuronal differentiation and motoric improvement. *J Anat* **212**, 19-30.
- Hagell P & Brundin P. (2001). Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 741-752.
- Hannila SS & Filbin MT. (2008). The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. *Exp Neurol* **209**, 321-332.
- Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, Nauert M, Gauger L, Kordower JH & Olanow CW. (1999). Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch Neurol* **56**, 179-187.
- He F, Wu LX, Shu KX, Liu FY, Yang LJ, Zhou X, Zhang Y, Huang BS, Huang D & Deng XL. (2008). HGF protects cultured cortical neurons against hypoxia/reoxygenation induced cell injury via ERK1/2 and PI-3K/Akt pathways. *Colloids Surf B Biointerfaces* **61**, 290-297.
- Hefti F. (1994). Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases. *J Neurobiol* **25**, 1418-1435.
- Herold S, Jagasia R, Merz K, Wassmer K & Lie DC. (2011). CREB signalling regulates early survival, neuronal gene expression and morphological development in adult subventricular zone neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* **46**, 79-88.
- Herrero MT & Luquin MR. (2004). Modelos experimentales de parkinsonismo. In *Tratado sobre la enfermedad de Parkinson*, 3ª edn, ed. 5 L, pp. 145-156. Madrid.
- Hirsch EC, Hoglinger G, Rousselet E, Breidert T, Parain K, Feger J, Ruberg M, Prigent A, Cohen-Salmon C & Launay JM. (2003). Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update. *J Neural Transm Suppl*, 89-100.
- Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I & Hirsch EC. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* **7**, 726-735.
- Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, Wang LC, Poulsen KT, Rosenblad C, Kirik D, Moffat B, Simmons L, Johnson E, Jr., Milbrandt J, Rosenthal A, Bjorklund A, Vandlen RA, Hynes MA & Phillips HS. (1998). Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* **18**, 4929-4937.
- Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ & Donnan GA. (2000). Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol* **166**, 127-135.
- Hughes PE, Alexi T, Walton M, Williams CE, Dragunow M, Clark RG & Gluckman PD. (1999). Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog Neurobiol* **57**, 421-450.
- Hung SY, Liou HC & Fu WM. (2010). The mechanism of heme oxygenase-1 action involved in the enhancement of neurotrophic factor expression. *Neuropharmacology* **58**, 321-329.
- Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP & Lindsay RM. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* **350**, 230-232.
- Ihrle RA & Alvarez-Buylla A. (2008). Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res* **331**, 179-191.

- Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G & Storm DR. (1998). Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* **21**, 869-883.
- Jankovic J. (2008). Parkinson's disease and movement disorders: moving forward. *Lancet Neurol* **7**, 9-11.
- Javitch JA & Snyder SH. (1984). Uptake of MPP(+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur J Pharmacol* **106**, 455-456.
- Jenner P & Olanow CW. (2006). The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology* **66**, S24-36.
- Jiang Q, Yan Z & Feng J. (2006). Neurotrophic factors stabilize microtubules and protect against rotenone toxicity on dopaminergic neurons. *J Biol Chem* **281**, 29391-29400.
- Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH & Shi JS. (2008). Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol* **600**, 78-82.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L & Greenberg DA. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11946-11950.
- Jones KR & Reichardt LF. (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8060-8064.
- Kaplan DR & Miller FD. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 381-391.
- Katakowski M, Chen J, Zhang ZG, Santra M, Wang Y & Chopp M. (2007). Stroke-induced subventricular zone proliferation is promoted by tumor necrosis factor- α -converting enzyme protease activity. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 669-678.
- Kearns CM & Gash DM. (1995). GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo. *Brain Res* **672**, 104-111.
- Kennea NL & Mehmet H. (2002). Neural stem cells. *J Pathol* **197**, 536-550.
- Kenney C, Simpson R, Hunter C, Ondo W, Almaguer M, Davidson A & Jankovic J. (2007). Short-term and long-term safety of deep brain stimulation in the treatment of movement disorders. *J Neurosurg* **106**, 621-625.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K & McKay R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50-56.
- Kim JY, Koh HC, Lee JY, Chang MY, Kim YC, Chung HY, Son H, Lee YS, Studer L, McKay R & Lee SH. (2003). Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem* **85**, 1443-1454.
- Kirik D, Georgievska B, Rosenblad C & Bjorklund A. (2001). Delayed infusion of GDNF promotes recovery of motor function in the partial lesion model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* **13**, 1589-1599.
- Kirik D, Rosenblad C & Bjorklund A. (1998). Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* **152**, 259-277.
- Kirik D, Rosenblad C & Bjorklund A. (2000a). Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. *Eur J Neurosci* **12**, 3871-3882.

- Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A & Mandel RJ. (2000b). Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J Neurosci* **20**, 4686-4700.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y & Shimizu N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-608.
- Klaidman LK, Adams JD, Jr., Leung AC, Kim SS & Cadenas E. (1993). Redox cycling of MPP+: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med* **15**, 169-179.
- Klassen HJ, Imfeld KL, Kirov, II, Tai L, Gage FH, Young MJ & Berman MA. (2003). Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells. *Cytokine* **22**, 101-106.
- Kokaia Z & Lindvall O. (2003). Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 127-132.
- Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N & Aebischer P. (2000). Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* **290**, 767-773.
- Kordower JH, Herzog CD, Dass B, Bakay RA, Stansell J, 3rd, Gasmi M & Bartus RT. (2006). Delivery of neurturin by AAV2 (CERE-120)-mediated gene transfer provides structural and functional neuroprotection and neurorestoration in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* **60**, 706-715.
- Kraft AD, McPherson CA & Harry GJ. (2009). Heterogeneity of microglia and TNF signaling as determinants for neuronal death or survival. *Neurotoxicology* **30**, 785-793.
- Kriegstein K. (2004). Factors promoting survival of mesencephalic dopaminergic neurons. *Cell Tissue Res* **318**, 73-80.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ & Gage FH. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* **17**, 5820-5829.
- LaBrecque DR & Bachur NR. (1982). Hepatic stimulator substance: physicochemical characteristics and specificity. *Am J Physiol* **242**, G281-288.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VG, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessl AJ, Matcham J, Coffey RJ & Traub M. (2006). Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol* **59**, 459-466.
- Lang AE & Lozano AM. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* **339**, 1044-1053.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW & Irwin I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**, 979-980.
- Lapchak PA, Araujo DM, Hilt DC, Sheng J & Jiao S. (1997). Adenoviral vector-mediated GDNF gene therapy in a rodent lesion model of late stage Parkinson's disease. *Brain Res* **777**, 153-160.

- Lapchak PA, Beck KD, Araujo DM, Irwin I, Langston JW & Hefti F. (1993). Chronic intranigral administration of brain-derived neurotrophic factor produces striatal dopaminergic hypofunction in unlesioned adult rats and fails to attenuate the decline of striatal dopaminergic function following medial forebrain bundle transection. *Neuroscience* **53**, 639-650.
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC & Steindler DA. (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13883-13888.
- Lee CS, Sauer H & Bjorklund A. (1996). Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neuroscience* **72**, 641-653.
- Lee HT, Chang YC, Tu YF & Huang CC. (2010). CREB activation mediates VEGF-A's protection of neurons and cerebral vascular endothelial cells. *J Neurochem* **113**, 79-91.
- Lee SI, Kim BG, Hwang DH, Kim HM & Kim SU. (2009). Overexpression of Bcl-XL in human neural stem cells promotes graft survival and functional recovery following transplantation in spinal cord injury. *J Neurosci Res* **87**, 3186-3197.
- Lendahl U, Zimmerman LB & McKay RD. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585-595.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD & Polymeropoulos MH. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* **395**, 451-452.
- Levi-Montalcini R & Hamburger V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* **116**, 321-361.
- Levison SW, Druckman SK, Young GM & Basu A. (2003). Neural stem cells in the subventricular zone are a source of astrocytes and oligodendrocytes, but not microglia. *Dev Neurosci* **25**, 184-196.
- Levivier M, Przedborski S, Bencsics C & Kang UJ. (1995). Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **15**, 7810-7820.
- Lewis-Tuffin LJ, Quinn PG & Chikaraishi DM. (2004). Tyrosine hydroxylase transcription depends primarily on cAMP response element activity, regardless of the type of inducing stimulus. *Mol Cell Neurosci* **25**, 536-547.
- Li H, He Z, Su T, Ma Y, Lu S, Dai C & Sun M. (2003). Protective action of recombinant neurturin on dopaminergic neurons in substantia nigra in a rhesus monkey model of Parkinson's disease. *Neurol Res* **25**, 263-267.
- Li M, Dai FR, Du XP, Yang QD & Chen Y. (2012). Neuroprotection by silencing iNOS expression in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* **48**, 225-233.
- Li Q, Ford MC, Lavik EB & Madri JA. (2006). Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study. *J Neurosci Res* **84**, 1656-1668.
- Liang J, Takeuchi H, Jin S, Noda M, Li H, Doi Y, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Mizuno T & Suzumura A. (2010). Glutamate induces neurotrophic factor production from microglia via protein kinase C pathway. *Brain Res* **1322**, 8-23.

- Lie DC, Dzieczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW & Gage FH. (2002). The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* **22**, 6639-6649.
- Lim J, Yang C, Hong SJ & Kim KS. (2000). Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by the cAMP-signaling pathway: involvement of multiple transcription factors. *Mol Cell Biochem* **212**, 51-60.
- Lin E, Cavanaugh JE, Leak RK, Perez RG & Zigmond MJ. (2008). Rapid activation of ERK by 6-hydroxydopamine promotes survival of dopaminergic cells. *J Neurosci Res* **86**, 108-117.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S & Collins F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* **260**, 1130-1132.
- Lindholm P, Voutilainen MH, Lauren J, Peranen J, Leppanen VM, Andressoo JO, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK & Saarma M. (2007). Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* **448**, 73-77.
- Lindner MD, Winn SR, Baetge EE, Hammang JP, Gentile FT, Doherty E, McDermott PE, Frydel B, Ullman MD, Schallert T & et al. (1995). Implantation of encapsulated catecholamine and GDNF-producing cells in rats with unilateral dopamine depletions and parkinsonian symptoms. *Exp Neurol* **132**, 62-76.
- Lindvall O, Rehncrona S, Brundin P, Gustavii B, Astedt B, Widner H, Lindholm T, Bjorklund A, Leenders KL, Rothwell JC, Frackowiak R, Marsden D, Johnels B, Steg G, Freedman R, Hoffer BJ, Seiger A, Bygdeman M, Stromberg I & Olson L. (1989). Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch Neurol* **46**, 615-631.
- Ling EA & Wong WC. (1993). The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* **7**, 9-18.
- Liste I, Garcia-Garcia E & Martinez-Serrano A. (2004). The generation of dopaminergic neurons by human neural stem cells is enhanced by Bcl-XL, both in vitro and in vivo. *J Neurosci* **24**, 10786-10795.
- Liu J & Huang HY. (2007). How to improve the survival of the fetal ventral mesencephalic cell transplanted in Parkinson's disease? *Neurosci Bull* **23**, 377-382.
- Liu L, Wang Y, Li B, Jia J, Sun Z, Zhang J, Tian J & Wang X. (2009). Evaluation of nigrostriatal damage and its change over weeks in a rat model of Parkinson's disease: small animal positron emission tomography studies with [(11)C]beta-CFT. *Nucl Med Biol* **36**, 941-947.
- Liu Y, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Prive GG, Eisenberg D, Brecha N & Edwards RH. (1992). A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* **70**, 539-551.
- Liu YZ, Boxer LM & Latchman DS. (1999). Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res* **27**, 2086-2090.
- Lobo MV, Alonso FJ, Redondo C, Lopez-Toledano MA, Caso E, Herranz AS, Paino CL, Reimers D & Bazan E. (2003). Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres. *J Histochem Cytochem* **51**, 89-103.

- Lopez-Toledano MA, Redondo C, Lobo MV, Reimers D, Herranz AS, Paino CL & Bazan E. (2004). Tyrosine hydroxylase induction by basic fibroblast growth factor and cyclic AMP analogs in striatal neural stem cells: role of ERK1/ERK2 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C. *J Histochem Cytochem* **52**, 1177-1189.
- Love S, Plaha P, Patel NK, Hotton GR, Brooks DJ & Gill SS. (2005). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. *Nat Med* **11**, 703-704.
- Lu J, Wu DM, Hu B, Zheng YL, Zhang ZF & Wang YJ. (2010). NGF-Dependent activation of TrkA pathway: A mechanism for the neuroprotective effect of troxerutin in D-galactose-treated mice. *Brain Pathol* **20**, 952-965.
- Lucking CB & Brice A. (2000). Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1894-1908.
- Ma DK, Ming GL & Song H. (2005). Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 514-520.
- Mandel RJ, Spratt SK, Snyder RO & Leff SE. (1997). Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14083-14088.
- Marks WJ, Jr., Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, Boulis N, Vitek J, Stacy M, Turner D, Verhagen L, Bakay R, Watts R, Guthrie B, Jankovic J, Simpson R, Tagliati M, Alterman R, Stern M, Baltuch G, Starr PA, Larson PS, Ostrem JL, Nutt J, Kieburtz K, Kordower JH & Olanow CW. (2010). Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol* **9**, 1164-1172.
- Marks WJ, Jr., Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, Taylor R, Cahn-Weiner DA, Stoessl AJ, Olanow CW & Bartus RT. (2008). Safety and tolerability of intraputamin delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol* **7**, 400-408.
- Martín-Hidalgo A, Arenas MI, Sacristán S, Huerta L, Díaz-Gil JJ, Carrillo E, Gómez-Pinillos A & Lobo MV. (2007a). Rat testis localization of VEGFs and VEGF receptors in control and testicular regeneration stimulated by the liver growth factor (LGF). *FEBS J* **274**, 296.
- Martín-Hidalgo A, Lobo MV, Sacristán S, Huerta L, Gómez-Pinillos A, Díaz-Gil JJ & Arenas MI. (2007b). Rat testicular regeneration after Eds administration is stimulated by the liver growth factor. *FEBS J* **274**, 296.
- Martinez-Galan L, del Puerto-Nevado L, Perez-Rial S, Diaz-Gil JJ, Gonzalez-Mangado N & Peces-Barba G. (2010). [Liver growth factor improves pulmonary fibrosis secondary to cadmium administration in mice]. *Arch Bronconeumol* **46**, 20-26.
- Mattay VS, Tessitore A, Callicott JH, Bertolino A, Goldberg TE, Chase TN, Hyde TM & Weinberger DR. (2002). Dopaminergic modulation of cortical function in patients with Parkinson's disease. *Ann Neurol* **51**, 156-164.
- Mazzio EA, Close F & Soliman KF. (2011). The biochemical and cellular basis for nutraceutical strategies to attenuate neurodegeneration in Parkinson's disease. *Int J Mol Sci* **12**, 506-569.
- McGinn MJ, Sun D, Schneider SL, Alexander JK & Colello RJ. (2004). Epidermal growth factor-induced cell proliferation in the adult rat striatum. *Brain Res* **1007**, 29-38.
- Mehta D & Malik AB. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* **86**, 279-367.

- Mena MA, Garcia de Yebenes MJ, Tabernero C, Casarejos MJ, Pardo B & Garcia de Yebenes J. (1995). Effects of calcium antagonists on the dopamine system. *Clin Neuropharmacol* **18**, 410-426.
- Mendez I, Dagher A, Hong M, Hebb A, Gaudet P, Law A, Weerasinghe S, King D, Desrosiers J, Darvesh S, Acorn T & Robertson H. (2000). Enhancement of survival of stored dopaminergic cells and promotion of graft survival by exposure of human fetal nigral tissue to glial cell line--derived neurotrophic factor in patients with Parkinson's disease. Report of two cases and technical considerations. *J Neurosurg* **92**, 863-869.
- Merello M & Cammarota A. (2000). Functional anatomy of the basal ganglia. *Rev Neurol* **30**, 1055-1060.
- Merkle FT & Alvarez-Buylla A. (2006). Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 704-709.
- Milosevic J, Schwarz SC, Maisel M, Poppe-Wagner M, Dieterlen MT, Storch A & Schwarz J. (2007). Dopamine D2/D3 receptor stimulation fails to promote dopaminergic neurogenesis of murine and human midbrain-derived neural precursor cells in vitro. *Stem Cells Dev* **16**, 625-635.
- Milligan SA, Owens MW & Grisham MB. (1998). Differential regulation of extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor-kappa B signal transduction pathways by hydrogen peroxide and tumor necrosis factor. *Arch Biochem Biophys* **352**, 255-262.
- Ming GL & Song H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **28**, 223-250.
- Mitchell HM, White DM, Domowicz MS & Kraig RP. (2011). Cold pre-conditioning neuroprotection depends on TNF-alpha and is enhanced by blockade of interleukin-11. *J Neurochem* **117**, 187-196.
- Mladenovic A, Perovic M, Raicevic N, Kanazir S, Rakic L & Ruzdijic S. (2004). 6-Hydroxydopamine increases the level of TNFalpha and bax mRNA in the striatum and induces apoptosis of dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. *Brain Res* **996**, 237-245.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Kogure O, Kuno S, Ichinose H & Nagatsu T. (2001). Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. *Neurosci Lett* **300**, 179-181.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H & Nagatsu T. (1999). Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **270**, 45-48.
- Mohapel P, Frielingsdorf H, Hagglblad J, Zachrisson O & Brundin P. (2005). Platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induce striatal neurogenesis in adult rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Neuroscience* **132**, 767-776.
- Monville C, Torres E, Thomas E, Scarpini CG, Muhith J, Lewis J, Finn J, Smith C, Cai S, Efstathiou S, Howard K & Dunnett SB. (2004). HSV vector-delivery of GDNF in a rat model of PD: partial efficacy obscured by vector toxicity. *Brain Res* **1024**, 1-15.
- Moolten FL & Bucher NL. (1967). Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation. *Science* **158**, 272-274.
- Mori T, Buffo A & Gotz M. (2005). The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* **69**, 67-99.
- Morley CG & Kingdon HS. (1973). The regulation of cell growth. I. Identification and partial characterization of a DNA synthesis stimulating factor from the serum of partially hepatectomized rats. *Biochim Biophys Acta* **308**, 260-275.

- Mosher KI, Andres RH, Fukuhara T, Bieri G, Hasegawa-Moriyama M, He Y, Guzman R & Wyss-Coray T. (2012). Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity. *Nat Neurosci* **15**, 1485-1487.
- Nakanishi M, Niidome T, Matsuda S, Akaike A, Kihara T & Sugimoto H. (2007). Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur J Neurosci* **25**, 649-658.
- Narantuya D, Nagai A, Sheikh AM, Wakabayashi K, Shiota Y, Watanabe T, Masuda J, Kobayashi S, Kim SU & Yamaguchi S. (2010). Microglia transplantation attenuates white matter injury in rat chronic ischemia model via matrix metalloproteinase-2 inhibition. *Brain Res* **1316**, 145-152.
- Natsume A, Mata M, Goss J, Huang S, Wolfe D, Oligino T, Glorioso J & Fink DJ. (2001). Bcl-2 and GDNF delivered by HSV-mediated gene transfer act additively to protect dopaminergic neurons from 6-OHDA-induced degeneration. *Exp Neurol* **169**, 231-238.
- Ninkovic J & Gotz M. (2007). Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Curr Opin Neurobiol* **17**, 338-344.
- Nishimura F, Yoshikawa M, Kanda S, Nonaka M, Yokota H, Shiroy A, Nakase H, Hirabayashi H, Oujy Y, Birumachi J, Ishizaka S & Sakaki T. (2003). Potential use of embryonic stem cells for the treatment of mouse parkinsonian models: improved behavior by transplantation of in vitro differentiated dopaminergic neurons from embryonic stem cells. *Stem Cells* **21**, 171-180.
- Noshita N, Lewen A, Sugawara T & Chan PH. (2001). Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 1442-1450.
- O'Keeffe GC, Barker RA & Caldwell MA. (2009). Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle* **8**, 2888-2894.
- Obeso JA, Grandas F, Vaamonde J, Luquin MR, Artieda J, Lera G, Rodriguez ME & Martinez-Lage JM. (1989). Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology* **39**, 11-19.
- Obeso JA, Rodriguez Oroz MC & Rodriguez Diaz M. (1998). [Physiopathology of Parkinson disease]. *Neurologia* **13 Suppl 1**, 19-29.
- Offen D, Shtaf B, Hadad D, Weizman A, Melamed E & Gil-Ad I. (2001). Protective effect of insulin-like-growth-factor-1 against dopamine-induced neurotoxicity in human and rodent neuronal cultures: possible implications for Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **316**, 129-132.
- Ogunshola OO, Antic A, Donoghue MJ, Fan SY, Kim H, Stewart WB, Madri JA & Ment LR. (2002). Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J Biol Chem* **277**, 11410-11415.
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A & Carmichael ST. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* **26**, 13007-13016.
- Oiwa Y, Yoshimura R, Nakai K & Itakura T. (2002). Dopaminergic neuroprotection and regeneration by neurturin assessed by using behavioral, biochemical and histochemical measurements in a model of progressive Parkinson's disease. *Brain Res* **947**, 271-283.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J & Freeman TB. (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **54**, 403-414.

- Olanow CW, Stern MB & Sethi K. (2009). The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* **72**, S1-136.
- Orth M & Tabrizi SJ. (2003). Models of Parkinson's disease. *Mov Disord* **18**, 729-737.
- Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA & Shamseddine AI. (2007). Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis* **39**, 212-220.
- Pahwa R, Factor SA, Lyons KE, Ondo WG, Gronseth G, Bronte-Stewart H, Hallett M, Miyasaki J, Stevens J & Weiner WJ. (2006). Practice Parameter: treatment of Parkinson disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **66**, 983-995.
- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW & Singleton AB. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* **44**, 595-600.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F & Gage FH. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* **19**, 8487-8497.
- Palmer TD, Willhoite AR & Gage FH. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* **425**, 479-494.
- Papavasiliou AK, Mehler MF, Dobrenis K, Marmur R, Mabie PC & Kessler JA. (1996). Microglial lineage species are expressed in mammalian epidermal growth factor-generated embryonic neurospheres. *J Neurosci Res* **46**, 49-57.
- Parain K, Murer MG, Yan Q, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E & Raisman-Vozari R. (1999). Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport* **10**, 557-561.
- Park CH, Kang JS, Shin YH, Chang MY, Chung S, Koh HC, Zhu MH, Oh SB, Lee YS, Panagiotakos G, Tabar V, Studer L & Lee SH. (2006). Acquisition of in vitro and in vivo functionality of Nurr1-induced dopamine neurons. *FASEB J* **20**, 2553-2555.
- Park IH, Yeon SI, Youn JH, Choi JE, Sasaki N, Choi IH & Shin JS. (2004). Expression of a novel secreted splice variant of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human brain astrocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Mol Immunol* **40**, 1203-1211.
- Park KW, Eglitis MA & Mouradian MM. (2001). Protection of nigral neurons by GDNF-engineered marrow cell transplantation. *Neurosci Res* **40**, 315-323.
- Parkinson J. (1817). *An essay on the Shaking Palsy*. Sherwood, Neely and Jones, Londres.
- Patapoutian A & Reichardt LF. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 272-280.
- Paul D, Leffert H, Sato G & Holley RW. (1972). Stimulation of DNA and protein synthesis in fetal-rat liver cells by serum from partially hepatectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 374-377.
- Paul G, Christophersen NS, Raymon H, Kiaer C, Smith R & Brundin P. (2007). Tyrosine hydroxylase expression is unstable in a human immortalized mesencephalic cell line--studies in vitro and after intracerebral grafting in vivo. *Mol Cell Neurosci* **34**, 390-399.
- Paxinos G & Watson C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.
- Payne J, Maher F, Simpson I, Mattice L & Davies P. (1997). Glucose transporter Glut 5 expression in microglial cells. *Glia* **21**, 327-331.

- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ & Luskin MB. (2001). Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* **21**, 6706-6717.
- Peng J, Xie L, Jin K, Greenberg DA & Andersen JK. (2008). Fibroblast growth factor 2 enhances striatal and nigral neurogenesis in the acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neuroscience* **153**, 664-670.
- Perez-Crespo M, Pericuesta E, Perez-Cereales S, Arenas MI, Lobo MV, Diaz-Gil JJ & Gutierrez-Adan A. (2011). Effect of liver growth factor on both testicular regeneration and recovery of spermatogenesis in busulfan-treated mice. *Reprod Biol Endocrinol* **9**, 21.
- Petrova P, Raibekas A, Pevsner J, Vigo N, Anafi M, Moore MK, Peaire AE, Shridhar V, Smith DI, Kelly J, Durocher Y & Commissiong JW. (2003). MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci* **20**, 173-188.
- Pluchino S, Zanotti L, Deleidi M & Martino G. (2005). Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **48**, 211-219.
- Polazzi E & Contestabile A. (2002). Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev Neurosci* **13**, 221-242.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI & Nussbaum RL. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045-2047.
- Popescu A & Lippa CF. (2004). Parkinsonian syndromes: Parkinson's disease dementia, dementia with Lewy bodies and progressive supranuclear palsy. *Clinical Neuroscience Research* **3**, 461-468.
- Porter CC, Totaro JA & Stone CA. (1963). Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther* **140**, 308-316.
- Predescu D, Vogel SM & Malik AB. (2004). Functional and morphological studies of protein transcytosis in continuous endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, L895-901.
- Ralay Ranaivo H & Wainwright MS. (2010). Albumin activates astrocytes and microglia through mitogen-activated protein kinase pathways. *Brain Res* **1313**, 222-231.
- Ramsay RR & Singer TP. (1986). Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* **261**, 7585-7587.
- Reichardt LF. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1545-1564.
- Reimers D, Gonzalo-Gobernado R, Herranz AS, Osuna C, Asensio MJ, Baena S, Rodriguez M & Bazan E. (2008). Driving neural stem cells towards a desired phenotype. *Curr Stem Cell Res Ther* **3**, 247-253.
- Reimers D, Lopez-Toledano MA, Mason I, Cuevas P, Redondo C, Herranz AS, Lobo MV & Bazan E. (2001). Developmental expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors in neural stem cell progeny. Modulation of neuronal and glial lineages by basic FGF treatment. *Neurol Res* **23**, 612-621.
- Reynolds BA, Tetzlaff W & Weiss S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* **12**, 4565-4574.

- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA & Ginty DD. (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* **286**, 2358-2361.
- Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratieck C & Sweatt JD. (1999). The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* **19**, 4337-4348.
- Rodriguez-Gomez JA, Lu JQ, Velasco I, Rivera S, Zoghbi SS, Liow JS, Musachio JL, Chin FT, Toyama H, Seidel J, Green MV, Thanos PK, Ichise M, Pike VW, Innis RB & McKay RD. (2007). Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* **25**, 918-928.
- Rosenblad C, Kirik D & Bjorklund A. (1999). Neurturin enhances the survival of intrastriatal fetal dopaminergic transplants. *Neuroreport* **10**, 1783-1787.
- Rosenblad C, Martinez-Serrano A & Bjorklund A. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor increases survival, growth and function of intrastriatal fetal nigral dopaminergic grafts. *Neuroscience* **75**, 979-985.
- Rosenstein JM & Krum JM. (2004). New roles for VEGF in nervous tissue--beyond blood vessels. *Exp Neurol* **187**, 246-253.
- Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF & Goldman SA. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* **12**, 1259-1268.
- Rozovsky I, Finch CE & Morgan TE. (1998). Age-related activation of microglia and astrocytes: in vitro studies show persistent phenotypes of aging, increased proliferation, and resistance to down-regulation. *Neurobiol Aging* **19**, 97-103.
- Russell WE, McGowan JA & Bucher NL. (1984). Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *J Cell Physiol* **119**, 183-192.
- Sagare AP, Winkler EA, Bell RD, Deane R & Zlokovic BV. (2011). From the liver to the blood-brain barrier: an interconnected system regulating brain amyloid-beta levels. *J Neurosci Res* **89**, 967-968.
- Sainson RC, Johnston DA, Chu HC, Holderfield MT, Nakatsu MN, Crampton SP, Davis J, Conn E & Hughes CC. (2008). TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood* **111**, 4997-5007.
- Sanchez-Pernaute R, Studer L, Bankiewicz KS, Major EO & McKay RD. (2001). In vitro generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. *J Neurosci Res* **65**, 284-288.
- Sariola H & Saarma M. (2003). Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* **116**, 3855-3862.
- Sauer H & Oertel WH. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* **59**, 401-415.
- Sauer H, Rosenblad C & Bjorklund A. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8935-8939.
- Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, Winkler J, Aigner L, Plate KH & Kuhn HG. (2004). Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* **14**, 237-248.

- Schmitt KR, Boato F, Diestel A, Hechler D, Kruglov A, Berger F & Hendrix S. (2010). Hypothermia-induced neurite outgrowth is mediated by tumor necrosis factor- α . *Brain Pathol* **20**, 771-779.
- Schober A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* **318**, 215-224.
- Schwartz RK & Huston JP. (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* **50**, 275-331.
- Senoh S, Creveling CR, Udenfriend S & Witkop B. (1959). Chemical, enzymatic, and metabolic studies on the mechanism of oxidation of dopamine. *J Am Chem Soc* **81**, 6236-6240.
- Senoh S & Witkop B. (1959). Non-enzymatic conversions of dopamine to norepinephrine and trihydroxyphenethylamine. *J Am Chem Soc* **81**, 6222-6231.
- Sharma R, McMillan CR & Niles LP. (2007). Neural stem cell transplantation and melatonin treatment in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Pineal Res* **43**, 245-254.
- Shein NA, Grigoriadis N, Horowitz M, Umschwief G, Alexandrovich AG, Simeonidou C, Grigoriadis S, Touloumi O & Shohami E. (2008). Microglial involvement in neuroprotection following experimental traumatic brain injury in heat-acclimated mice. *Brain Res* **1244**, 132-141.
- Shen LH, Li Y & Chopp M. (2010). Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats. *Glia* **58**, 1074-1081.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K & Temple S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* **304**, 1338-1340.
- Sherer TB, Fiske BK, Svendsen CN, Lang AE & Langston JW. (2006). Crossroads in GDNF therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord* **21**, 136-141.
- Shults CW, Kimber T & Altar CA. (1995). BDNF attenuates the effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroreport* **6**, 1109-1112.
- Singer TP, Castagnoli N, Jr., Ramsay RR & Trevor AJ. (1987). Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem* **49**, 1-8.
- Singh J & Bowers LD. (1986). Quantitative fractionation of serum bilirubin species by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **380**, 321-330.
- Slevin JT, Gerhardt GA, Smith CD, Gash DM, Kryscio R & Young B. (2005). Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputaminial infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosurg* **102**, 216-222.
- Smith BA, Goldberg NR & Meshul CK. (2011). Effects of treadmill exercise on behavioral recovery and neural changes in the substantia nigra and striatum of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse. *Brain Res* **1386**, 70-80.
- Somoza B, Abderrahim F, Gonzalez JM, Conde MV, Arribas SM, Starcher B, Regadera J, Fernandez-Alfonso MS, Diaz-Gil JJ & Gonzalez MC. (2006). Short-term treatment of spontaneously hypertensive rats with liver growth factor reduces carotid artery fibrosis, improves vascular function, and lowers blood pressure. *Cardiovasc Res* **69**, 764-771.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R & Goedert M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839-840.

- Spina MB, Squinto SP, Miller J, Lindsay RM & Hyman C. (1992). Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *J Neurochem* **59**, 99-106.
- Stanic D, Tripanichkul W, Drago J, Finkelstein DI & Horne MK. (2004). Glial responses associated with dopaminergic striatal reinnervation following lesions of the rat substantia nigra. *Brain Res* **1023**, 83-91.
- Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A & Schwarz J. (2001). Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol* **170**, 317-325.
- Streit WJ. (1990). An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from *Griffonia simplicifolia* (GSA I-B4). *J Histochem Cytochem* **38**, 1683-1686.
- Streit WJ. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* **40**, 133-139.
- Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A & Greenberg DA. (2003). VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* **111**, 1843-1851.
- Sung JY, Shin SW, Ahn YS & Chung KC. (2001). Basic fibroblast growth factor-induced activation of novel CREB kinase during the differentiation of immortalized hippocampal cells. *J Biol Chem* **276**, 13858-13866.
- Surra JC, Guillen N, Barranquero C, Arbones-Mainar JM, Navarro MA, Gascon S, Arnal C, Godino J, Guzman MA, Diaz-Gil JJ & Osada J. (2010). Sex-dependent effect of liver growth factor on atherosclerotic lesions and fatty liver disease in apolipoprotein E knockout mice. *Histol Histopathol* **25**, 609-618.
- Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K & Nakata Y. (2004). Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* **24**, 1-7.
- Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, Fukuda H, Okamoto Y, Koyanagi M, Ideguchi M, Hayashi H, Imazato T, Kawasaki H, Suemori H, Omachi S, Iida H, Itoh N, Nakatsuji N, Sasai Y & Hashimoto N. (2005). Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest* **115**, 102-109.
- Taupin P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* **53**, 198-214.
- Teismann P & Schulz JB. (2004). Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res* **318**, 149-161.
- Temple S & Alvarez-Buylla A. (1999). Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 135-141.
- Teng FY & Tang BL. (2006). Axonal regeneration in adult CNS neurons--signaling molecules and pathways. *J Neurochem* **96**, 1501-1508.
- Teng H, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Zhang L, Morris D, Gregg SR, Wu Z, Jiang A, Lu M, Zlokovic BV & Chopp M. (2008). Coupling of angiogenesis and neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 764-771.
- Teramoto T, Qiu J, Plumier JC & Moskowitz MA. (2003). EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. *J Clin Invest* **111**, 1125-1132.

- Theofilopoulos S, Goggi J, Riaz SS, Jauniaux E, Stern GM & Bradford HF. (2001). Parallel induction of the formation of dopamine and its metabolites with induction of tyrosine hydroxylase expression in foetal rat and human cerebral cortical cells by brain-derived neurotrophic factor and glial-cell derived neurotrophic factor. *Brain Res Dev Brain Res* **127**, 111-122.
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z & Lindvall O. (2006). Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* **24**, 739-747.
- Thornalley PJ. (1998). Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **44**, 1013-1023.
- Tsukahara T, Takeda M, Shimohama S, Ohara O & Hashimoto N. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery* **37**, 733-739; discussion 739-741.
- Ungerstedt U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* **5**, 107-110.
- Ungerstedt U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* **367**, 1-48.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G & Wood NW. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**, 1158-1160.
- van den Berge SA, van Strien ME, Korecka JA, Dijkstra AA, Sluijs JA, Kooijman L, Eggers R, De Filippis L, Vescovi AL, Verhaagen J, van de Berg WD & Hol EM. (2011). The proliferative capacity of the subventricular zone is maintained in the parkinsonian brain. *Brain* **134**, 3249-3263.
- Van Kampen JM & Eckman CB. (2006). Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *J Neurosci* **26**, 7272-7280.
- Van Kampen JM, Hagg T & Robertson HA. (2004). Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D3 receptor stimulation. *Eur J Neurosci* **19**, 2377-2387.
- Van Kampen JM & Robertson HA. (2005). A possible role for dopamine D3 receptor stimulation in the induction of neurogenesis in the adult rat substantia nigra. *Neuroscience* **136**, 381-386.
- Vastag B. (2010). Biotechnology: Crossing the barrier. *Nature* **466**, 916-918.
- Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD & Weiss S. (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* **11**, 951-966.
- Vescovi AL, Rietze R, Magli MC & Bjornson C. (2002). Hematopoietic potential of neural stem cells. *Nat Med* **8**, 535; author reply 536-537.
- Vilhardt F. (2005). Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 17-21.
- Voutilainen MH, Back S, Porsti E, Toppinen L, Lindgren L, Lindholm P, Peranen J, Saarma M & Tuominen RK. (2009). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **29**, 9651-9659.
- Wagner J, Akerud P, Castro DS, Holm PC, Canals JM, Snyder EY, Perlmann T & Arenas E. (1999). Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol* **17**, 653-659.

- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP, 2nd, Scheffler B & Steindler DA. (2006). Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* **54**, 815-825.
- Wang W, Ji P & Dow KE. (2003). Corticotropin-releasing hormone induces proliferation and TNF-alpha release in cultured rat microglia via MAP kinase signalling pathways. *J Neurochem* **84**, 189-195.
- Wang Y, Chen S, Yang D & Le WD. (2007a). Stem cell transplantation: a promising therapy for Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* **2**, 243-250.
- Wang YQ, Guo X, Qiu MH, Feng XY & Sun FY. (2007b). VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Res* **85**, 73-82.
- Wang Z, Li DD, Liang YY, Wang DS & Cai NS. (2002). Activation of astrocytes by advanced glycation end products: cytokines induction and nitric oxide release. *Acta Pharmacol Sin* **23**, 974-980.
- Watson F, Kiernan RS, Deavall DG, Varro A & Dimaline R. (2001). Transcriptional activation of the rat vesicular monoamine transporter 2 promoter in gastric epithelial cells: regulation by gastrin. *J Biol Chem* **276**, 7661-7671.
- Wei P, Liu J, Zhou HL, Han ZT, Wu QY, Pang JX, Liu S & Wang TH. (2007). Effects of engrafted neural stem cells derived from GFP transgenic mice in Parkinson's diseases rats. *Neurosci Lett* **419**, 49-54.
- Weinstein DE, Burrola P & Kilpatrick TJ. (1996). Increased proliferation of precursor cells in the adult rat brain after targeted lesioning. *Brain Res* **743**, 11-16.
- Weng Z, Signore AP, Gao Y, Wang S, Zhang F, Hastings T, Yin XM & Chen J. (2007). Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* **282**, 34479-34491.
- Wetmore C & Olson L. (1995). Neuronal and nonneuronal expression of neurotrophins and their receptors in sensory and sympathetic ganglia suggest new intercellular trophic interactions. *J Comp Neurol* **353**, 143-159.
- Widera D, Holtkamp W, Entschladen F, Niggemann B, Zanker K, Kaltschmidt B & Kaltschmidt C. (2004). MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur J Cell Biol* **83**, 381-387.
- Wine RN, McPherson CA & Harry GJ. (2009). IGF-1 and pAKT signaling promote hippocampal CA1 neuronal survival following injury to dentate granule cells. *Neurotox Res* **16**, 280-292.
- Winkler C, Fricker RA, Gates MA, Olsson M, Hammang JP, Carpenter MK & Bjorklund A. (1998). Incorporation and glial differentiation of mouse EGF-responsive neural progenitor cells after transplantation into the embryonic rat brain. *Mol Cell Neurosci* **11**, 99-116.
- Wu JP, Kuo JS, Liu YL & Tzeng SF. (2000). Tumor necrosis factor-alpha modulates the proliferation of neural progenitors in the subventricular/ventricular zone of adult rat brain. *Neurosci Lett* **292**, 203-206.
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H & Sawamoto K. (2006). Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* **26**, 6627-6636.
- Yan M, Dai H, Ding T, Dai A, Zhang F, Yu L, Chen G & Chen Z. (2011). Effects of dexmedetomidine on the release of glial cell line-derived neurotrophic factor from rat astrocyte cells. *Neurochem Int* **58**, 549-557.

- Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA & Feinstein SC. (1997b). Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* **378**, 135-157.
- Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L & Welcher AA. (1997a). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* **78**, 431-448.
- Yan YP, Sailor KA, Lang BT, Park SW, Vemuganti R & Dempsey RJ. (2007). Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 1213-1224.
- Yang HK, Sundholm-Peters NL, Goings GE, Walker AS, Hyland K & Szele FG. (2004). Distribution of doublecortin expressing cells near the lateral ventricles in the adult mouse brain. *J Neurosci Res* **76**, 282-295.
- Yang X & Cheng B. (2010). Neuroprotective and anti-inflammatory activities of ketogenic diet on MPTP-induced neurotoxicity. *J Mol Neurosci* **42**, 145-153.
- Yasuhara T, Shingo T, Kobayashi K, Takeuchi A, Yano A, Muraoka K, Matsui T, Miyoshi Y, Hamada H & Date I. (2004). Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) upon dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* **19**, 1494-1504.
- Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kobayashi K, Takeuchi A, Yano A, Wenji Y, Kameda M, Matsui T, Miyoshi Y & Date I. (2005). Early transplantation of an encapsulated glial cell line-derived neurotrophic factor-producing cell demonstrating strong neuroprotective effects in a rat model of Parkinson disease. *J Neurosurg* **102**, 80-89.
- Yuan H, Zhu X, Zhou S, Chen Q, Ma X, He X, Tian M & Shi X. (2010). Role of mast cell activation in inducing microglial cells to release neurotrophin. *J Neurosci Res* **88**, 1348-1354.
- Zhang Z, Miyoshi Y, Lapchak PA, Collins F, Hilt D, Lebel C, Kryscio R & Gash DM. (1997). Dose response to intraventricular glial cell line-derived neurotrophic factor administration in parkinsonian monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **282**, 1396-1401.
- Zhao H, Sapolsky RM & Steinberg GK. (2006). Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Mol Neurobiol* **34**, 249-270.
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J & Janson AM. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7925-7930.
- Zhu Q, Ma J, Yu L & Yuan C. (2009). Grafted neural stem cells migrate to substantia nigra and improve behavior in Parkinsonian rats. *Neurosci Lett* **462**, 213-218.
- Zhu ZH, Yang R, Fu X, Wang YQ & Wu GC. (2006). Astrocyte-conditioned medium protecting hippocampal neurons in primary cultures against corticosterone-induced damages via PI3-K/Akt signal pathway. *Brain Res* **1114**, 1-10.
- Zigmond MJ. (2006). Triggering endogenous neuroprotective mechanisms in Parkinson's disease: studies with a cellular model. *J Neural Transm Suppl*, 439-442.
- Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ & Luskin MB. (1998). Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* **11**, 234-245.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Muller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK & Gasser T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* **44**, 601-607.

- Ziv I, Offen D, Haviv R, Stein R, Panet H, Zilkha-Falb R, Shirvan A, Barzilai A & Melamed E. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 inhibits cellular toxicity of dopamine: possible implications for Parkinson's disease. *Apoptosis* **2**, 149-155.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J & Schwartz M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* **9**, 268-275.

ANEXO

1. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

OPEN ACCESS Freely available online



Neuroprotective Activity of Peripherally Administered Liver Growth Factor in a Rat Model of Parkinson's Disease

Rafael Gonzalo-Gobernado¹, Lucía Calatrava-Ferreras¹, Diana Reimers¹, Antonio Sánchez Herranz¹, Macarena Rodríguez-Serrano¹, Cristina Miranda¹, Adriano Jiménez-Escrig², Juan José Díaz-Gil³, Eulalia Bazán^{1*}

1 Servicio de Neurobiología, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain, **2** Servicio de Neurología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, **3** Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid, Spain

Abstract

Liver growth factor (LGF) is a hepatic mitogen purified some years ago that promotes proliferation of different cell types and the regeneration of damaged tissues, including brain tissue. Considering the possibility that LGF could be used as a therapeutic agent in Parkinson's disease, we analyzed its potential neuroregenerative and/or neuroprotective activity when peripherally administered to unilaterally 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rats. For these studies, rats subjected to nigrostriatal lesions were treated intraperitoneally twice a week with LGF (5 microg/rat) for 3 weeks. Animals were sacrificed 4 weeks after the last LGF treatment. The results show that LGF stimulates sprouting of tyrosine hydroxylase-positive terminals and increases tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression, as well as dopamine levels in the denervated striatum of 6-OHDA-lesioned rats. In this structure, LGF activates microglia and raises tumor necrosis factor- α protein levels, which have been reported to have a role in neuroregeneration and neuroprotection. Besides, LGF stimulates the phosphorylation of MAPK/ERK1/2 and CREB, and regulates the expression of proteins which are critical for cell survival such as Bcl2 and Akt. Because LGF partially protects dopamine neurons from 6-OHDA neurotoxicity in the substantia nigra, and reduces motor deficits in these animals, we propose LGF as a novel factor that may be useful in the treatment of Parkinson's disease.

Citation: Gonzalo-Gobernado R, Calatrava-Ferreras L, Reimers D, Herranz AS, Rodríguez-Serrano M, et al. (2013) Neuroprotective Activity of Peripherally Administered Liver Growth Factor in a Rat Model of Parkinson's Disease. PLoS ONE 8(7): e67771. doi:10.1371/journal.pone.0067771

Editor: Malú G. Tansey, Emory University, United States of America

Received: January 28, 2013; **Accepted:** May 22, 2013; **Published:** July 4, 2013

Copyright: © 2013 Gonzalo-Gobernado et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias (FISS PI060315) and Agencia Laín Entralgo (NDG7/09). LC and RG-G were the recipients of Agencia Laín Entralgo and FIBio Hospital Ramón y Cajal fellowships, respectively, and MRS was the recipient of a Contrato de Personal de Apoyo a la Investigación (FISS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: eulalia.bazan@hrc.es

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder involving a progressive loss of dopaminergic (DA) neurons projecting from the substantia nigra (SN) to the striatum. The most widely used therapeutic approach is the administration of levodopa, but it loses effectiveness after several years of treatment. Neurotrophic factors are compounds that enhance the survival and differentiation of selected types of neurons, including DA neurons [1]. Liver growth factor (LGF) is a hepatic mitogen purified by Díaz-Gil and colleagues some years ago [2]. Following an in-depth chemical and immunological study, they demonstrated that LGF is an albumin-bilirubin complex, the concentration of which is nearly undetectable in sera from healthy humans or rats, but dramatically increases in the presence of hepatobiliary disorders or liver injury [3,4]. Recent studies show that LGF promotes proliferation of different cell types [5–9] and the regeneration of damaged cells and tissues, including brain tissue. Thus, the intracerebral infusion of LGF stimulates the sprouting of DA terminals in the striatum of unilaterally 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rats [10], and promotes the expansion of

neural precursors and the generation of new neurons in this experimental model of PD [11]. Moreover, its delivery into the brain enhances cell viability of grafted neural stem cells, and favors their differentiation to an endothelial-like phenotype [12].

The first targets of LGF in liver are portal vein endothelial cells [13], while DA sprouting and neurogenesis seem to be mediated by activated microglia/macrophages and reactive astrocytes [10,11]. Besides, the mitogenic activity of LGF in rat liver is mediated by local and temporary up-regulation of tumor necrosis factor- α (TNF- α) [13], a cytokine synthesized and released by activated microglia [14,15], which has recently been reported to have a role in neuroregeneration and neuroprotection [16–18].

Considering the possibility that LGF could be used as a therapeutic agent in PD, we analyze the potential neuroregenerative and/or neuroprotective activity of intraperitoneally administered LGF (IP-LGF) in a known model of PD in rats. Here we report that IP-LGF raises DA levels and stimulates the outgrowth of DA terminals in the striatum of unilaterally 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rats and protects DA neurons from 6-OHDA neurotoxicity. Moreover, IP-LGF reduces apomorphine-induced rotational behavior and improves motor performance in these

ARTICLE

Mobilization of Neural Stem Cells and Generation of New Neurons in 6-OHDA-lesioned Rats by Intracerebroventricular Infusion of Liver Growth Factor

Rafael Gonzalo-Gobernado, Diana Reimers, Antonio S. Herranz, Juan José Díaz-Gil, Cristina Osuna, María José Asensio, Silvia Baena, Macarena Rodríguez-Serrano, and Eulalia Bazán

Servicio de Neurobiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain (RG-G,DR,ASH,CO,MJA,SB,MR-S,EB), and Servicio de Bioquímica Experimental, Hospital Puerta de Hierro, Madrid, Spain (JD-G)

SUMMARY Neural stem cells with self-renewal and multilineage potential persist in the subventricular zone of the adult mammalian forebrain. These cells remain relatively quiescent but, under certain conditions, can be stimulated, giving rise to new neurons. Liver growth factor (LGF) is a mitogen for liver cells that shows biological activity in extrahepatic sites and is useful for neuroregenerative therapies. The aim of this study was to investigate the potential neurogenic activity of LGF in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. Proliferation was significantly increased in the subventricular zone and denervated striatum of rats receiving ICV LGF infusions, and 25% of the proliferating cells were doublecortin-positive neurons. Doublecortin-positive cells with the morphology of migrating neuroblasts were also observed in the dorsal and ventral regions of the striatum of LGF-infused animals. Moreover, some newly generated cells were neuronal nuclei-positive mature neurons. LGF also stimulated microglia and induced astrogliosis, both phenomena associated with generation and migration of new neurons in the adult brain. In summary, our study shows that LGF stimulates neurogenesis when applied intraventricularly in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. Considering that this factor also promotes neuronal migration into damaged tissue, we propose LGF as a novel factor useful for neuronal replacement in neurodegenerative diseases.

(J Histochem Cytochem 57:491–502, 2009)

KEY WORDS

neural stem cells
 neurogenesis
 trophic factors
 Parkinson's disease
 liver growth factor
 microglia

PROGRESSIVE NEURODEGENERATIVE DISEASES, such as Parkinson's disease (PD), require restoration of a specific neuronal phenotype and its afferent-efferent connections. Neural stem cells (NSCs) are defined as clonogenic cells with self-renewal capacity and the ability to generate all neural lineages (multipotentiality) (Bazán et al. 2004; Pluchino et al. 2005; Merkle and Alvarez-Buylla 2006). Damaged or dead neurons could be replaced by transplanted NSCs, but cell replacement strategies remain a remote possibility because of the difficulties in overcoming transplant rejection. The recent finding that endogenous NSCs reside in the subventricular zone (SVZ) and dentate gyrus of the adult mammalian brain

(Arias-Carrión et al. 2007; Jin and Galvan 2007) opens the possibility of using these resident NSCs for cell replacement therapies in neurological disorders (Geraerts et al. 2007; Lim et al. 2007; Okano et al. 2007). Neurotrophic factors are compounds that enhance the survival and differentiation of selected types of neurons (Fernandez-Espejo 2004; Kriegstein 2004). In addition, they are also crucial for the expansion and differentiation of NSCs in vitro and in vivo (Palmer et al. 1999; Reimers et al. 2001; Lopez-Toledano et al. 2004; Hagg 2005,2007; Ninkovic and Götz 2007). Liver growth factor (LGF) is a hepatic mitogen that was purified by Díaz-Gil et al. (1986) some years ago. After an in-depth chemical and immunological study, they showed that LGF is an albumin–bilirubin complex, the concentration of which is nearly undetectable in sera from healthy humans or rats but dramatically increases in the presence of hepatobiliary disorders or liver injury (Díaz-Gil et al. 1987,1988). Recent studies have shown that

Correspondence to: Dr. Eulalia Bazán, Servicio de Neurobiología, Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar Km. 9.1, 28034 Madrid, Spain. E-mail: eulalia.bazan@hrc.es

Received for publication July 9, 2008; accepted January 13, 2009 [DOI: 10.1369/jhc.2009.952275].

Liver Growth Factor Promotes the Survival of Grafted Neural Stem Cells in a Rat Model of Parkinson's Disease

Diana Reimers¹, Cristina Osuna¹, Rafael Gonzalo-Gobernado¹, Antonio S¹. Herranz, Juan José Díaz-Gil², Adriano Jiménez-Escrig³, María José Asensio¹, Cristina Miranda¹, Macarena Rodríguez-Serrano¹ and Eulalia Bazán^{1,*}

¹Servicio de Neurobiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid-28034, Spain; ²Servicio de Bioquímica Experimental, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Mahadahonda, Madrid, Spain; ³Servicio de Neurología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid

Abstract: Neural stem cells (NSCs) with self-renewal and multilineage potential are considered good candidates for cell replacement of damaged nerve tissue. Several studies have focused on the ability of the neurotrophic factors co-administration to improve the efficiency of grafted NSCs. Liver growth factor (LGF) is a hepatic mitogen that promotes regeneration of damaged tissues, including brain tissue. It has neurogenic activity and has partially restored the nigrostriatal dopaminergic system in an experimental model of Parkinson's disease. Present results demonstrate that in the dopamine-depleted striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats, grafted NSCs retained their ability to differentiate into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. NSCs also differentiated into microglia/macrophages and endothelial cells. Thus, 23 ± 5.6% of them were immunoreactive for isolectin IB4, and a small population integrated into blood vessels, showing an endothelial-like morphology. Intrastriatal infusion of LGF promoted the viability of the implants, and favored their differentiation to an endothelial-like phenotype. Moreover, LGF infusion raised the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 by 3.9 ± 0.9 fold without affecting the levels of the pro-apoptotic protein Bax. Since LGF-treated rats also showed a significant reduction in apomorphine-induced rotational behavior, our results suggest that administration of this factor might be a convenient treatment for Parkinson's disease cell replacement therapies based on NSCs transplantation.

Keywords: Neural stem cells, neuroregeneration, CNS transplantation, Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, neurotrophic factors, liver growth factor.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder involving a progressive loss of dopaminergic (DA) neurons projecting from the substantia nigra (SN) to the striatum [1]. The most widely used therapeutic approach is the administration of levodopa, but it loses effectiveness after several years of treatment. Cell replacement strategies have emerged as a promising approach for restoration of function in neurodegenerative diseases [2, 3]. Developing neural tissue has been used to replace damaged or dead DA neurons in PD [4, 5]. However, there is still no agreement regarding the ideal cell source for transplantation due to the inflammatory responses that compromise long-term graft survival, and the problems associated with the use of tissue from aborted fetuses [6, 7].

Neural stem cells (NSCs) are defined as clonogenic cells with self-renewal capacity and multilineage potential [8]. Cells with these characteristics have been isolated from the embryonic and adult Central Nervous System (CNS) [9-11]. Under specific conditions, these cells proliferate in culture as

cell clusters, called neurospheres, and differentiate into neurons, glia, and non-neural cell types [12-15]. These cultures represent a potential source for cell replacement therapy [16-19], but their use in PD remains unclear due to their low survival, and the lack of DA differentiation when grafted in the adult brain [20].

Recent studies suggest that the co-administration of trophic factors could improve the efficiency of grafted NSCs in PD [21, 22]. Neurotrophic factors are compounds that enhance the survival and differentiation of selected types of neurons [23, 24]. In addition, they are also critical for the expansion and differentiation of NSCs *in vitro* and *in vivo* [25]. Liver growth factor (LGF) is a hepatic mitogen purified by Diaz-Gil and colleagues some years ago [26]. Following an in-depth chemical and immunological study, they demonstrated that LGF is an albumin-bilirubin complex, the concentration of which is nearly undetectable in sera from healthy humans or rats, but dramatically increases in the presence of hepatobiliary disorders or liver injury [27, 28]. Recent studies show that LGF promotes proliferation of different cell types [29-31], and the regeneration of damaged tissues, including brain tissue. Thus, the intracerebral infusion of LGF stimulates the sprouting of DA terminals in the striatum of unilaterally 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rats [32]. Moreover, LGF promotes the expansion

*Address correspondence to this author at the Servicio de Neurobiología, Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar Km. 9,1, 28034-Madrid, Spain; Tel.: 34-91-3368385; Fax: 34-91-3369016; E-mail: Eulalia.bazan@hrc.es (E. Bazan)

ARTICLE

Intrastriatal Infusion of Liver Growth Factor Stimulates Dopamine Terminal Sprouting and Partially Restores Motor Function in 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rats

Diana Reimers,¹ Antonio S. Herranz,¹ Juan José Díaz-Gil, M^a Val T. Lobo, Carlos L. Paño, Raquel Alonso, M^a José Asensio, Rafael Gonzalo-Gobernado, and Eulalia Bazán

Servicio de Neurobiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain (DR,ASH,MVTL,CLP,RA,MJA,RG-G,EB); Servicio de Bioquímica Experimental, Hospital Puerta de Hierro, Madrid, Spain (JJD-G); and Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain (MVTL)

SUMMARY Liver growth factor (LGF) is a mitogen for liver cells that shows biological activity in extrahepatic sites and may be useful for neuroregenerative therapies. The aim of this work was to investigate the effects of the intrastriatal (IS) infusion of LGF in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. Tyrosine hydroxylase-positive innervation was significantly increased in the dopamine-denervated striatum of rats receiving intrastriatal LGF infusions (160 ng/day/rat \times 15 days) as compared with a vehicle-infused group. There was no evidence of dopaminergic neurogenesis in the striatum or substantia nigra in any experimental group at the times studied. However, in those animals undergoing IS-LGF infusion for 48 hr, we found a significant increase in both microglial proliferation and in the number of microglial cells that acquired the amoeboid morphology. This is characteristic of activated microglia/macrophages that has been reported to play an important role in dopamine terminal sprouting. In summary, our study shows that IS infusion of LGF stimulates the outgrowth of tyrosine hydroxylase-positive terminals in the striatum of 6-hydroxydopamine-treated rats. As apomorphine-induced rotational behavior was also reduced in these animals, we propose LGF as a novel factor that, when delivered to the striatum, may be useful in the treatment of Parkinson's disease. (*J Histochem Cytochem* 54:457–465, 2006)

KEY WORDS

neuroregeneration
 neurogenesis
 trophic factors
 dopamine
 Parkinson's disease
 liver growth factor
 microglia

PARKINSON'S DISEASE (PD) is a neurodegenerative disorder involving a progressive loss of dopaminergic (DA) neurons projecting from the substantia nigra (SN) to the striatum. The most widely used therapeutic approach is the administration of levodopa, but it loses effectiveness after several years of treatment. Neurotrophic factors are compounds that enhance the survival and differentiation of selected types of neurons and, therefore, are considered promising therapeutic agents for the treatment of neurodegenerative disorders characterized by selective degeneration of certain neuronal groups (García de Yébenes and Mena 2000;

Fernandez-Espejo 2004; Kriegstein 2004). In addition, they are also critical for the expansion and differentiation of neural progenitors, a new and promising tool in neuroregeneration (Palmer et al. 1999; Reimers et al. 2001; Bazán et al. 2004; Lopez-Toledano et al. 2004).

Liver growth factor (LGF), a hepatic mitogen with both in vivo and in vitro activity, was purified by our group some years ago (Díaz-Gil et al. 1986). LGF and hepatic growth factor (HGF) are two completely different entities in terms of molecular weight, chemical structure, activity in hepatocytes, and even the active concentration in brain (LGF, 160 ng/day/rat, see Materials and Methods; HGF, 1.4–4.2 μ g/day/rat) (Date et al. 2004). Following an in-depth chemical and immunological study, we demonstrated that LGF is an albumin–bilirubin complex (Díaz-Gil et al. 1987, 1988, 1989). In a model of CCL₄-induced cirrhosis in rats, LGF injection decreased total liver collagen; restored serum enzymes, partial architectural integrity,

Correspondence to: Dr. Eulalia Bazán, Servicio de Neurobiología-Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar Km. 9.1, 28034 Madrid, España. E-mail: eulalia.bazan@hrc.es

¹These authors contributed equally to this work.

Received for publication August 4, 2005; accepted November 19, 2005 [DOI: 10.1369/jhc.5A6805.2005].

2. OTRAS PUBLICACIONES

2.1 Artículos en revistas internacionales

- Carolina Redondo, Miguel A. López-Toledano, Maria V. T. Lobo, **Rafael Gonzalo-Gobernado**, Diana Reimers, Antonio S. Herranz, Carlos L. Paño and Eulalia Bazán. *Kainic Acid Triggers Oligodendrocyte Progenitor Cell Proliferation and Neuronal Differentiation from Striatal Neural Stem Cells*. “Journal of Neuroscience Research” 2007 85(6):1170-82.
- Eulalia Bazán, Antonio S Herranz, Maria VT Lobo, Diana Reimers, Carolina Redondo, Miguel A. López-Toledano, **Rafael Gonzalo-Gobernado**, Maria J Asensio, and Raquel Alonso. Neural stem cells and taurine. Stem Cell Research Journal, 2007, 1 (1,2): 29-44.
- José A. Rodríguez*, **Rafael Gonzalo-Gobernado***, José M. González-Vigueras, Antonio S. Herranz and José M. Solís. *High Potassium induces Taurine release by osmosensitive and osmoresistant mechanisms in the rat hippocampus in vivo*. “Journal of Neuroscience Research” 87:208–217 (2009). (*coautores).
- Diana Reimers, **Rafael Gonzalo-Gobernado**, Antonio S. Herranz, Maria J. Asensio, Silvia Baena, Macarena Rodríguez, and Eulalia Bazán. *Driving Neural Stem Cells Towards a Desired Phenotype*. “Current Stem Cell Research & Therapy”, 2008, Dec 3(4):4247-253.
- A. Sánchez Herranz, **R. Gonzalo-Gobernado**, D. Reimers, Asensio MJ, Rodríguez-Serrano M and E. Bazán. Applications of human umbilical cord blood cells in Central Nervous System regeneration. “Current Stem Cell Research & Therapy”. 2010, 5, 17-22.
- Lucía Calatrava-Ferreras, **Rafael Gonzalo-Gobernado**, Antonio S. Herranz, et al., “Effects of Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Stem Cells in 3-Acetylpyridine-Lesioned Rats,” Stem Cells International, vol. 2012, Article ID 135187, 14 pages, 2012. doi:10.1155/2012/135187.
- Reimers D, **Gonzalo-Gobernado R**, Herranz AS, Calatrava-Ferreras L, Barrio LC, Montero-Vega T and Bazán E. Hypothalamic blood vessels provide anatomical interconnection between groups of magnocellular neurons located outside the Supraoptic and Paraventricular nuclei. (En Revisión “Plos One”, Agosto 2013).

2.2 Capítulos en Libros

- Bazán, E, Herranz AS, Reimers D, Redondo C, Lobo MVT, **Gonzalo-Gobernado R**, Asensio MJ, Alonso R. Neural Stem Cells and Taurine. In Frank Columbus, ed. Neural Stem Cell Research. Nova Science Publishers, Inc., pg. 99-114, 2006.
- A. Sánchez Herranz, **R. Gonzalo-Gobernado**, D. Reimers y E. Bazán. Células madre de cordón umbilical y sus aplicaciones en medicina regenerativa del Sistema Nervioso Central. Jaime Pérez de Oteyza (Dir.). ed CEU Ediciones. Documento de Investigación Biomédica. Número 1 / 2008. Páginas 83-102.
- Lucía Calatrava*, **Rafael Gonzalo-Gobernado***, Antonio S. Herranz, Diana Reimers, Maria J. Asensio, Cristina Miranda and Eulalia Bazán. Role of Growth Factor Receptors in Neural Stem Cells Differentiation and Dopaminergic Neurons Generation. Neural Stem Cells and Therapy, Tao Sun (Ed.), ISBN: 978-953-307-958-5, InTech. 2012. (* coautores).

2.3 Publicaciones en revistas nacionales:

- E.Bazán Izquierdo, D.Reimers Cerdá, A.Sánchez Herranz, J.J. Díaz Gil, **R. Gonzalo-Gobernado R**, Alonso Cabanillas, María J Asensio Vega. Factor de crecimiento del hígado como factor de proliferación, migración y diferenciación de las células madre neurales y su posible utilidad en enfermedad de Parkinson. Revista de Neurología. 2005. 41 (Supl 2):55-95.
- **Gonzalo-Gobernado R**, Reimers D, Bazán E, Díaz-Gil JJ, Herranz AS. El LGF estimula la proliferación y la migración de las células madre neurales adultas de la zona subventricular en ratas parkinsonianas. Revista de Neurología. 2007. 45(3):175-187.
- **R. Gonzalo-Gobernado**, D. Reimers, E. Bazán, J.J. Díaz Gil, A.S. Herranz. Neurogénesis en Parkinson Experimental. Revista de Neurología.2008 47(6): 323-330.
- Sánchez Herranz, **R. Gonzalo-Gobernado**, D. Reimers, E. Bazán, J.J. Díaz Gil, C. Osuna, M. Rodríguez, C. Miranda, M.J. Asensio. Inducción de neurogénesis en Parkinson experimental. Revista de Neurología. 2009. 48 (2):94-106.

2.4 Participación en proyectos de investigación:

- Estimulación de la Neurogénesis y el Crecimiento Axonal Inducidos por el Liver Growth Factor (LGF) en un Modelo Experimental de Enfermedad de Parkinson. Mecanismos Celulares y Moleculares. Fondo de Investigaciones Sanitarias. (FIS PI060315).2007-2009.
- Efectos del Factor de Crecimiento de Hígado (LGF) sobre un modelo de Parkinson experimental. Pfizer y FIBIO-HRyC. 2005-2008.
- El Factor de crecimiento de Hígado "LGF" como posible agente terapéutico para distintos tipos de Ataxia. Colectivo Ataxias en Movimiento-Caja Navarra. (FIBIO-HRyC). 2008-2009.
- El Factor de Crecimiento de Hígado "LGF" como alternativa terapéutica en la Ataxia de Friedreich. FIBIO-HRyC. (PI2009/118). 2009-2011.
- Uso del factor crecimiento de hígado (LGF) en la ataxia de Friedreich. Estudios *in vivo* e *in vitro*. Agencia Pedro Laín Entralgo (NDG09/07). 2010-2012.